

AUS DEM INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE  
FRAU PROFESSOR DR. D. MÄNNEL  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

# **Die Charakterisierung myeloider Suppressorzellen im Modell der experimentellen Leishmaniose**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Biomedizinischen Wissenschaften  
- Dr. rer. physiol. -

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Maximilian Schmid

Dezember 2013

AUS DEM INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE  
FRAU PROFESSOR DR. D. MÄNNEL  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

# **Die Charakterisierung myeloider Suppressorzellen im Modell der experimentellen Leishmaniose**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Biomedizinischen Wissenschaften  
- Dr. rer. physiol. -

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Maximilian Schmid

Dezember 2013

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von November 2010 bis Dezember 2013 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Uwe Ritter am Institut für Immunologie der Universität Regensburg.

**Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:**

11.12.2013

**Die Arbeit wurde angeleitet von:**

Betreuer: Professor Dr. Uwe Ritter

1. Mentor: Professorin Dr. Daniela Männel
2. Mentor: Privatdozent Dr. Ger van Zandbergen

Dekan: Professor Dr. Dr. Torsten E. Reichert

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich, Maximilian Schmid geboren am 24.10.1984 in Kempten erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs-bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

---

Maximilian Schmid

*„Es gibt kein großes Genie ohne einen Schuss Verrücktheit“*  
(Aristoteles, griechischer Philosoph)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Das angeborene Immunsystem	1
1.2 Das adaptive Immunsystem	2
1.3 Das mononukleäre Phagozyten-System (MPS)	3
1.4 Die Chemokine und Chemokin-Rezeptoren	5
1.4.1 Monozyten und der Chemokin-Rezeptor CCR2	6
1.5 Myeloide Suppressorzellen	7
1.5.1 Molekulare Mechanismen der Suppression	9
1.5.2 Myeloide Suppressorzellen bei weiteren Krankheitsbildern	10
1.6 Die Leishmaniose	11
1.6.1 Taxonomie	11
1.6.2 Lebenszyklus der Leishmanien	12
1.6.3 Die Leishmaniose des Menschen	14
1.6.4 Das experimentelle Modell der Leishmaniose in der Maus	15
1.6.5 Die Immunantwort gegen <i>Leishmania major</i>	17
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	19
<b>2. Material und Methoden</b>	21
2.1 Material	21
2.1.1 Laborgeräte	21
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen	22
2.1.3 Medium und Puffer	24
2.1.4 Antikörper	25
2.1.5 Oligonukleotide	26
2.1.6 Glas- und Plastikmaterialien	27
2.1.7 Mauslinien	28
2.1.8 Leishmanien-Stamm	28
2.1.9 Software	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellbiologische Methoden	30
2.2.1.1 Herstellung von Blutagarplatten für die Leishmanienkultur	30
2.2.1.2 Leishmanienkultur	30
2.2.1.3 Herstellung von Leishmaniantigen (SLA)	31
2.2.1.4 Blutentnahme und Herstellung von Seren	31
2.2.1.5 Herstellung einer polyklonalen anti-SLA-IgG-Fraktion	31
2.2.1.6 Zellzählung	32
2.2.1.7 Isolierung von Zellen aus dem Knochenmark, Milz und Lymphknoten	32
2.2.1.8 Isolierung von Zellen aus dem Fußgewebe	33
2.2.1.9 Herstellung von GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand	33
2.2.1.10 Generierung von Knochenmark-dendritischen Zellen (BMDC) und <i>in vitro</i> myeloiden Suppressorzellen (MDSC)	33

2.2.1.11 Durchflusszytometrie (FACS) .....	34
2.2.1.12 Zellseparation mittels Durchflusszytometrie (FACSaria) .....	36
2.2.1.13 Magnetische Zellseparation (MACS = <i>magnetic activated cell sorting</i> ) .....	36
2.2.1.14 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) .....	37
2.2.1.15 Immunfluoreszenzfärbung .....	38
2.2.1.16 CFSE-Markierung von <i>L. major</i> oder T Zellen .....	38
2.2.1.17 Generierung von peritoneal Exudat Makrophagen (peritoneal exudate cells = PECs) .....	39
2.2.1.18 <i>Leishmanien</i> -spezifischer T-Zell Suppressionsassay .....	39
2.2.1.19 Nitritnachweis in Zellkultur-Überständen (Griess-Reaktion) .....	41
2.2.2 Tierversuche .....	41
2.2.2.1 Infektion mit <i>L. major</i> , Fußdickenmessung und DTH-Reaktion .....	41
2.2.2.2 Gemcitabin Behandlung von Mäusen .....	42
2.2.2.3 Nachweis der Zellproliferation <i>in vivo</i> mittels BrdU .....	42
2.2.2.4 Generierung von Knochenmark-Chimären Mäusen (CCR2 <sup>-/-</sup> ↔ WT) .....	42
2.2.3 Molekularbiologische Methoden .....	44
2.2.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus Organen .....	44
2.2.3.2 RNA Isolierung aus <i>in vitro</i> Zellkulturen .....	44
2.2.3.3 Reverse Transkription von RNA .....	45
2.2.3.4 qRT-PCR zum Nachweis von iNOS, Arginase-1 und IDO mRNA ....	45
2.2.3.5 qRT-PCR zur Bestimmung der Parasitenlast in Organen .....	47
2.3 Statistik .....	48
<b>3. Ergebnisse</b> .....	49
3.1 Charakterisierung von MDSCs in naiven C57BL/6- und BALB/c-Mäusen .....	49
3.1.1 Durchflusszytometrische Analyse von Knochenmark, Blut, Milz, poplitealen Lymphknoten und Fussgewebe .....	49
3.1.2 Histologische Analyse von poplitealen Lymphknoten aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen .....	52
3.2 <i>in vitro</i> Charakterisierung von MDSCs in der Leishmaniose .....	54
3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse von <i>in vitro</i> generierten MDSCs .....	54
3.2.2 Ko-Kultur von CFSE-markierten <i>L. major</i> mit <i>in vitro</i> generierten MDSCs ....	55
3.2.3 iNOS und Arginase-1 Expression von <i>in vitro</i> generierten MDSCs .....	58
3.2.3.1 iNOS und Arginase-1 Expression während der Differenzierung mit GM-CSF .....	58
3.2.3.2 iNOS und Arginase-1 Expression während <i>L. major</i> Ko-Kultur .....	58
3.2.3.3 Arginase-1 und iNOS Expression in Mo-MDSCs .....	60
3.2.4 <i>Leishmanien</i> antigen-spezifischer Suppressionsassay mit <i>in vitro</i> generierten MDSCs .....	61
3.2.4.1 Einfluss auf die Funktionalität von <i>in vitro</i> generierten MDSCs durch <i>L. major</i> .....	61
3.2.4.2 Einfluss auf die Funktionalität von <i>in vitro</i> generierten MDSCs durch Differenzierung mit all- <i>trans</i> Retinsäure (ATRA) .....	63

3.2.4.3 Einfluss auf die Funktionalität von <i>in vitro</i> generierten MDSCs durch Arginase-1- und iNOS-Inhibitoren .....	66
3.3 <i>In vivo</i> Charakterisierung von MDSCs in der Leishmaniose .....	68
3.3.1 Durchflusszytometrische Analyse von Knochenmark, Blut, Milz, poplitealen Lymphknoten und Fussgewebe 10 Tage nach <i>L. major</i> Infektion ...	68
3.3.2 <i>In vivo</i> Detektion von proliferierenden myeloiden Zellen während einer <i>L. major</i> Infektion.....	71
3.3.3 Depletion myeloider Zellen mit Gemcitabin während einer <i>L. major</i> Infektion	73
3.4 Die Bedeutung von CCR2 für das ‚homing‘ von MDSCs .....	75
3.4.1 Die Expression von CCR2 auf der Zelloberfläche von MDSCs .....	75
3.4.2 Der Verlauf einer Leishmaniose in CCR2 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	76
3.4.3 Untersuchung von Knochenmark-Chimären während einer Leishmanieninfektion (CCR2 <sup>-/-</sup> ↔ WT) .....	80
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>86</b>
4.1 <i>In vitro</i> Charakterisierung von MDSCs in der Leishmaniose .....	87
4.2 <i>In vivo</i> Charakterisierung von MDSCs in der Leishmaniose .....	90
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>108</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>110</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
APC	Allophycocyanin
APC	<i>antigen presenting cell</i>
Arg-1	Arginase-1
BMDC	<i>bone marrow-derived dendritic cell</i>
Bp	Basenpaar
BrdU	Bromdeoxyuridin
CCL	Chemokinrezeptor-Ligand
CCR	C-C Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC/SSC	<i>forward/side scatter</i> , Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hanks' buffered salt solution</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
iNOS	induzierbare NO-Synthase

i.v.	intravenös
kDa	Kilo Dalton
L.	<i>Leishmania</i>
Ly6C	Lymphozytenantigen Lokus 6C
Ly6G	Lymphozytenantigen Lokus 6G
M	molar
ml	Milliliter
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i> (myeloide Suppressorzelle)
MHC-Klasse I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse I/II
Mo-MDSC	<i>monocytic myeloid-derived suppressor cell</i>
mRNA	messenger RNA
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PMN-MDSC	<i>polymorphonucleated myeloid-derived suppressor cell</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SLA	<i>soluble Leishmania-antigen</i>
TAE	Tris-Acetat EDTA
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
Tween 20	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

## 1.1 Das angeborene Immunsystem

Alle höheren Lebewesen besitzen Abwehrmechanismen zur Bekämpfung von Krankheitserregern. Allgemein werden diese Abwehrreaktionen als Immunantwort bezeichnet. Das Immunsystem wird in das angeborene und in das erworbene Immunsystem (auch adaptives Immunsystem genannt) unterteilt. Durchbricht ein Pathogen die physikalischen Barrieren eines Organismus, wie die Haut und Schleimhäute, dringen diese in das Gewebe ein und rufen eine Immunantwort hervor. Als erstes werden dabei Zellen und Mechanismen der angeborenen Immunität aktiviert. Hierbei spielen myeloide Zellen, d.h. Zellen die im Knochenmark gebildet werden, und das hämatopoetische System eine zentrale Rolle. Dazu gehören Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen (K. Murphy et al. 2009). Eine der ersten Zelltypen, die auf einen eingedrungenen Krankheitserreger reagieren sind Makrophagen, die im Gewebe vorhanden sind. Diese Zellen sind zur Phagozytose fähig, d.h. die aktive Aufnahme von extrazellulären Partikel. Wichtig für eine erfolgreiche Phagozytose und die anschließende Eliminierung des Pathogens ist die schnelle Erkennung des fremden Organismus durch Rezeptoren. Hierzu zählen PRRs (*pathogen recognition receptors*) wie die C-Typ Lektin Rezeptoren (McGreal et al. 2005), intrazelluläre NOD-like Rezeptoren (NLR) (Martinon und Tschopp 2005) oder Toll-like Rezeptoren (TLR) (K. Murphy et al. 2009; Trinchieri und Sher 2007). Diese Rezeptoren erkennen konservierte Moleküle auf der Oberfläche von Krankheitserregern, die als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) bezeichnet werden. Die Aktivierung solcher Rezeptoren löst in Makrophagen und Granulozyten die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen aus. Darunter fallen beispielsweise Interleukin (IL)-1, IL-6, CXCL-8 (im murinen System nicht vorhanden) sowie der Tumornekrosefaktor (TNF). Chemokine wie CXCL-8 locken neutrophile Granulozyten aus dem Blutstrom zum Entzündungsherd, die dort ihrerseits Krankheitserreger phagozytieren können (Kolaczowska und Kubes 2013). Die Zytokinfreisetzung hat weitreichende Effekte zur Folge, wie z.B. die Erhöhung der Körpertemperatur, die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen aus der Leber oder die erhöhte Permeabilität von Blutgefäßen, die den zusätzlichen Einstrom von Leukozyten zum Entzündungsherd zulässt (K. Murphy et al. 2009). Ein weiterer Bestandteil der angeborenen Immunität sind Komplementfaktoren im Plasma, die eine Opsonisierung von Pathogenen bewirken und es Phagozyten dadurch ermöglichen, die so gekennzeichneten Erreger zu

zerstören. Reichen all diese Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems nicht aus, um den Krankheitserreger dauerhaft zu beseitigen, ist es unumgänglich, eine adaptive Immunantwort einzuleiten. Eine wichtige Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität stellen dabei dendritische Zellen (*dendritic cell* = DC) dar.

## 1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem zeichnet sich die erworbene Immunität durch antigenspezifische Immunantworten aus. Des Weiteren wird durch das adaptive Immunsystem ein immunologisches Gedächtnis gebildet, das für eine erneute Infektion mit dem selben Erreger von enormer Bedeutung ist. Die Zellen, die dem adaptiven Immunsystem zugerechnet werden, heißen Lymphozyten. Man unterscheidet zwischen T- und B-Lymphozyten, die im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden. Dabei verweilen reife B-Zellen im Knochenmark, wohingegen T-Zellen in den Thymus zur abschließenden Reifung wandern (Germain 2002; Pieper et al. 2013). Beide Zelltypen finden sich in sekundären lymphatischen Geweben, wie der Milz und den Lymphknoten, wieder. In diesen Organen finden die Antigenpräsentation und die darauf folgende Induktion der adaptiven Immunantwort statt. DCs, aber auch Makrophagen, phagozytieren während einer Infektion den Krankheitserreger und können diesen im sogenannten Phagolysosom verdauen. Dabei werden Peptid-Sequenzen des Erregers auf Haupthistokompatibilitäts-komplexe (*major histocompatibility complex* = MHC) geladen und auf der Oberfläche der dendritischen Zellen präsentiert. Es gibt MHC Klasse-I Proteine, die hauptsächlich Antigene aus dem Zytosol präsentieren, und MHC Klasse-II Proteine, die überwiegend mit Antigenen aus dem Phagolysosom beladen werden (Blum et al. 2013). Findet sich eine T-Zelle mit einem passenden T-Zell-Rezeptor, der das präsentierte Antigen erkennt, wird diese T-Zelle aktiviert und zu einer T-Effektorzelle. Dabei binden MHC Klasse-I Moleküle an den Korezeptor CD8 und MHC Klasse-II Moleküle an den Korezeptor CD4 auf T-Zellen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen können zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren, die die antigenpräsentierende Zelle durch Granzyme und Perforine zerstören (K. Murphy et al. 2009). CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) genannt, wobei man zwischen T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, und T<sub>H</sub>17-Helferzellen sowie regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>) unterscheidet. Aktivierte T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren Zytokine wie IL-12 und Interferon (IFN)- $\gamma$ , um Makrophagen zu aktivieren, und unterstützen B-Zellen bei der Antikörperproduktion. T<sub>H</sub>2-Helferzellen hingegen produzieren nach ihrer Aktivierung hauptsächlich IL-4, IL-5 und IL-10, die vor allem bei Helminthen-Infektionen sowie bei

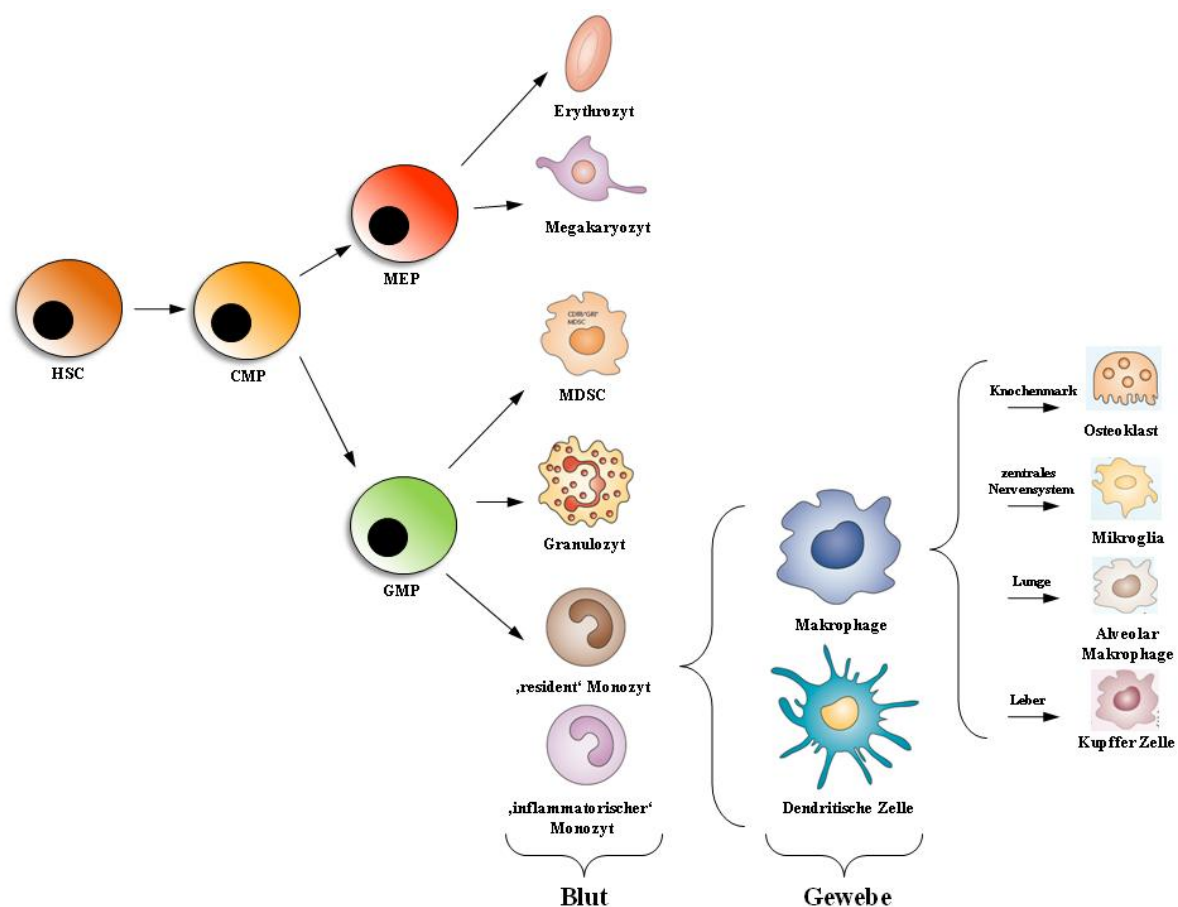
allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle einnehmen (K. Murphy et al. 2009). T<sub>H</sub>17-Zellen produzieren IL-17, das die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsort unterstützt (Dong 2008). Einen anti-inflammatorischen Effekt besitzen T<sub>regs</sub>, die über verschiedene Mechanismen eine Immunantwort supprimieren können (Sakaguchi et al. 2010) (siehe auch 1.5.1). T-Lymphozyten bilden damit den zellvermittelten Teil des adaptiven Immunsystems.

Die antikörpervermittelte (humorale) adaptive Immunantwort wird durch B-Lymphozyten hervorgerufen. B-Zellen sind ebenfalls in der Lage Antigene zu präsentieren (Abbas 1989). Eine anschließende Aktivierung durch T-Helferzellen fördert die Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen. Nach der sogenannten Affinitätsreifung können Plasmazellen spezifische, nur gegen ein Antigen gerichtete, lösliche Rezeptoren bilden, die besser als Antikörper bekannt sind. Diese können Krankheitserreger oder deren schädlichen Produkte markieren, so dass sie von Makrophagen über Fc-Rezeptoren erkannt und phagozytiert werden. Ein Teil der B- und T-Zellen können zu langlebigen Gedächtniszellen differenzieren, die bei einer erneuten Erkrankung mit demselben Erreger zu einer schnelleren Immunantwort führen (K. Murphy et al. 2009).

### 1.3 Das mononukleäre Phagozyten-System (MPS)

Wie bereits in 1.1 erwähnt, werden myeloide Zellen im Knochenmark gebildet. Dabei differenzieren sich aus hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells* = HSC, vgl. Abb. 1.1) zunächst myeloide Vorläuferzellen (*common myeloid precursor* = CMP, vgl. Abb. 1.1) (Imhof und Aurrand-Lions 2004). Aus diesem Vorläufer können sich nun Megakaryozyten-Erythrozytenvorläufer (*megakaryocyte-erythrocyte precursor* = MEP, vgl. Abb. 1.1) und Granulozyten-Monozytenvorläufer (*granulocyte-monocyte precursor* = GMP, vgl. Abb. 1.1) entwickeln. Erstere differenzieren weiter zu Erythrozyten, GMPs können sich zu Monozyten und Granulozyten weiterentwickeln oder in einem undifferenzierten Phänotyp verweilen, der als myeloide Suppressorzelle (MDSC) bezeichnet wird (Gabrilovich und Nagaraj 2009). MDSCs sind in der Lage Immunantworten durch verschiedene Mechanismen zu hemmen (siehe 1.5). Granulozyten dagegen stellen einen differenzierten Zelltyp dar, wohingegen Monozyten noch die Fähigkeit besitzen zu anderen Zelltypen zu differenzieren (Gordon und Taylor 2005). Monozyten können über bestimmte Signale (z.B. C-C Chemokin-Ligand 2 (CCL-2), siehe 1.4) in den Blutstrom einwandern, um anschließend in das Zielgewebe zu gelangen. Dort angekommen, führen weitere Signale dazu, dass sich

Monozyten in Gewebsmakrophagen oder dendritische Zellen differenzieren. Im Gehirn werden Makrophagen Mikroglia-Zellen, in der Leber Kupffer-Zellen, in der Lunge alveolare Makrophagen und im Knochenmark Osteoklasten genannt (Gordon und Taylor 2005). Die Hauptfunktion von Makrophagen besteht darin, eingedrungene Pathogene zu erkennen, zu phagozytieren und anschließend zu zerstören. Dazu wird in den Phagolysosomen der pH-Wert erniedrigt, Stickoxide wie NO werden durch das Enzym induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS) produziert, ebenso wie reaktive Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species* = ROS). All diese Mechanismen haben eine direkte toxische Wirkung auf den Krankheitserreger (K. Murphy et al. 2009). Weiterhin produzieren Makrophagen, die einen Erreger aufgenommen haben, proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL8 und TNF, was eine weitere Aktivierung des Immunsystems zur Folge hat. In den verschiedenen Geweben haben Makrophagen unterschiedliche weitere Funktionen. Osteoklasten besitzen beispielsweise die Fähigkeit Knochen neu zu bilden, wohingegen alveolare Makrophagen mehr PRRs exprimieren als andere Makrophagen (Gordon und Taylor 2005). In der Milz sind Makrophagen hauptsächlich für die Beseitigung von apoptotischen Erythrozyten verantwortlich (K. Murphy et al. 2009).



**Abb. 1.1.: Das mononukleäre Phagozyten-System.** Aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) entwickeln sich myeloide Vorläuferzellen (*common myeloid progenitor* = CMP). Aus diesen unreifen Zellen können nun entweder über einen Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläufer (MEP), Erythrozyten oder Megakaryozyten entstehen, oder über einen Granulozyten-Makrophagen Vorläufer (GMP), Granulozyten, Monozyten oder myeloide Suppressorzellen (MDSCs). Bei Monozyten kann zwischen ‚resident‘ und ‚inflammatorischen‘ Monozyten unterschieden werden. Monozyten können im Gewebe zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren. Je nach Organ werden bei Makrophagen zwischen Osteoklasten (Knochenmark), Mikroglia (ZNS), alveolar Makrophagen (Lunge) und Kupffer Zellen (Leber) unterschieden (Übernommen und abgeändert aus Imhof und Aurrand-Lions 2004; Gordon und Taylor 2005).

Neben Makrophagen im Gewebe sind neutrophile Granulozyten die zweite Zellgruppe der Phagozyten. Diese werden auf chemotaktischem Weg zum Ziel geführt. Neutrophile werden hauptsächlich über das Chemokin CXCL8 (in der Maus über CCL3 Wolpe et al. 1988), das von Makrophagen sezerniert wird, zum Entzündungsort geleitet. Dort angekommen, verfügen sie über meist gleiche Mechanismen wie Makrophagen, d.h. Phagozytose und die Produktion von ROS (K. Murphy et al. 2009). Der genaue Ablauf der Haptotaxis wird im folgenden Abschnitt erläutert.

## 1.4 Die Chemokine und Chemokin-Rezeptoren

Unter Haptotaxis versteht man eine gerichtete Bewegung von Zellen zu einem Konzentrationsgradienten hin (Carter 1967; McCarthy et al. 1983). Im Falle des Immunsystems werden Zytokine, die eine Haptotaxis auslösen können, als Chemokine bezeichnet. Chemokine, die im Organsimus membrangebunden vorliegen, binden an Chemokin-Rezeptoren, die alle die Struktur eines 7-Transmembran-Rezeptors besitzen und an G-Proteine gekoppelt sind, um so eine Signaltransduktion zu erreichen (Baggiolini 1998). Wurde der Chemokin-Rezeptor durch die Bindung eines Liganden aktiviert, so kann die Zelle den Rezeptor in Vesikel internalisieren, um ihn anschließend wieder an die Zellmembran zu transportieren oder mittels Proteasomen abzubauen. Diese Sensibilisierung der Chemokin-Rezeptoren bewirkt eine gerichtete Migration der Zelle zu einem Chemokin-Gradienten hin. Neben der Hauptfunktion der Chemokine, Leukozyten zum Ort ihrer Bestimmung zu dirigieren, haben einige Chemokine auch eine wichtige Rolle in der Lymphozyten-Entwicklung (XCL-1) oder der Angiogenese (CXCL-1,-2,-3,-7, und CXCL-8) (K. Murphy et al. 2009). Der auf naiven T-Zellen exprimierte Chemokin-Rezeptor CCR7 ist dafür verantwortlich, dass naive T-Zellen im gesunden Organismus in den Lymphknoten wandern, um dort auf eine passende antigenpräsentierende Zelle zu treffen. Dementsprechend ist die Expression der CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 im Lymphknoten hoch (Bachmann et al.

2006). Nach der Aktivierung der T-Zelle wird der Rezeptor CCR7 internalisiert und andere Chemokin-Rezeptoren werden verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert. Dazu zählen unter anderem CCR2 und CCR5, deren Liganden (CCL2, CCL-7, CCL8, CCL-13 für CCR2 und CCL3-5 für CCR5) stark in Entzündungsherden produziert werden (Proudfoot 2002). Das hat zur Folge, dass aktivierte T-Zellen den Lymphknoten verlassen können und Zellen des angeborenen Immunsystems am Ort der Entzündung unterstützen.

Auch Monozyten werden über eine CCR2-vermittelte Haptotaxis zu entzündeten Geweben rekrutiert, was im folgenden Abschnitt genauer beschrieben wird.

#### 1.4.1 Monozyten und der Chemokin-Rezeptor CCR2

Monozyten entstehen aus einem myeloiden Vorläufer im Knochenmark (Abb. 1.1). Reife Monozyten können anhand ihrer Oberflächenmarker in zwei Subtypen unterteilt werden: zum einen gibt es ‚residente‘ Monozyten mit dem Phänotyp  $CD11b^+ F4/80^+ CX3CR1^{high} CD62L^- CCR2^- Ly6C^{low}$  und ‚inflammatorische‘ Monozyten mit dem Phänotyp  $CD11b^+ F4/80^+ CX3CR1^{high} CD62L^+ CCR2^+ Ly6C^{high}$  (Abb.1.1 und Gordon und Taylor 2005; Yona und Jung 2010). Beide Untergruppen können sowohl im Knochenmark als auch im Blutstrom nachgewiesen werden. Inflammatorische Monozyten werden bei einer entstehenden Infektion innerhalb weniger Stunden aus dem Knochenmark CCR2-abhängig zum Entzündungsort rekrutiert (Serbina und Pamer 2006). Dort angekommen produzieren sie TNF und IL-1 und können zu inflammatorischen DCs weiterdifferenzieren. In einem gesunden Organismus können  $Ly6C^{high}$  Monozyten auch die residenten DCs im Gewebe, wie Verdauungstrakt, Haut und Lunge, durch Erneuerung ersetzen (Auffray et al. 2007). Von ‚residenten‘ Monozyten wird hingegen angenommen, dass diese im gesunden Organismus am Gefäßendothel entlang wandern und erst bei einer Entzündung aus dem Blutstrom migrieren. Daraufhin dringen ‚residente‘ Monozyten in das entzündete Gewebe ein und differenzieren zu Makrophagen (Auffray et al. 2007). Weiterhin wurde beschrieben, dass ‚residente‘ Monozyten sowohl bei der Angiogenese als auch bei der Gewebsneubildung eine bedeutende Rolle spielen (Yona und Jung 2010; Auffray et al. 2007).

Für inflammatorische Monozyten ist bekannt, dass das Austreten aus dem Knochenmark über den Chemokin-Rezeptor CCR2 vermittelt wird. Liganden für den Chemokin-Rezeptor sind CCL2, CCL7, CCL8 und CCL13 (Proudfoot 2002). In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit CCL2 als spezifischer Ligand für CCR2 gearbeitet. CCL2 ist ein 13kDa schweres Protein, das auf der Plasmamembran von Endothel- sowie Epithelzellen, Fibroblasten, Monozyten und



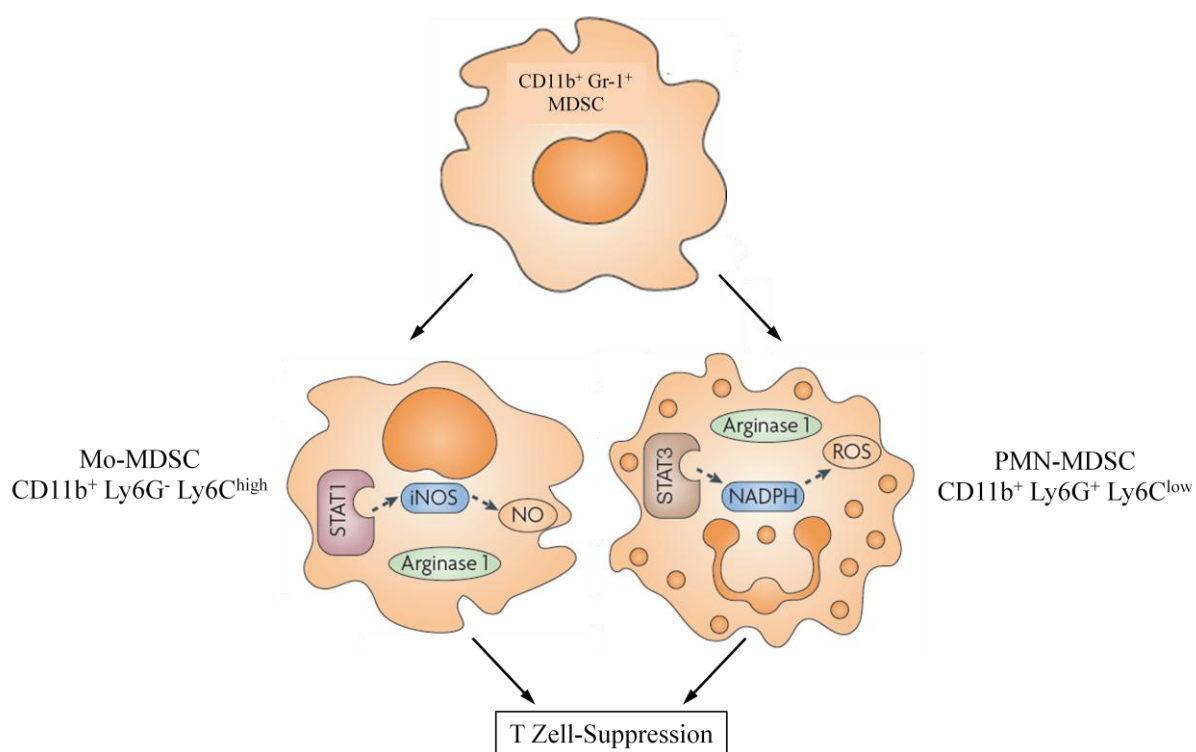
Mikrogliazellen im zentralen Nervensystem exprimiert wird (Yadav et al. 2010). Neben Monozyten werden auch T-Gedächtniszellen und DCs zum Infektionsort geleitet. Die Expression von CCL2 kann durch verschiedene Zytokine, wie dem von Thrombozyten produzierten Wachstumsfaktor (PDGF = *platelet-derived growth factor*), IL-1, IL-4, TNF, der Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF = *vascular endothelial growth factor*), Lipopolysaccharid (LPS), und IFN- $\gamma$ , induziert werden. Im Gegensatz dazu inhibieren Glucocorticoide, Retinsäure und Östrogen die CCL2 Expression (Melgarejo et al. 2009). Nachdem CCL2 an den Rezeptor CCR2 gebunden hat, wird die Signaltransduktion über G-Proteine weitergeleitet. Diese endet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und einer  $\text{Ca}^{2+}$ - Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, was für die darauffolgende Mobilität und Haptotaxis eine wichtige Rolle spielt (Melgarejo et al. 2009). Neben der induzierten Steigerung der Migration von Monozyten, können Makrophagen durch CCL2 aktiviert werden, um intrazelluläre Krankheitserreger abzutöten (Ritter und Moll 2000; Serbina et al. 2003).

Die beschriebenen CCR2/CCL2-abhängigen chemotaktischen Vorgänge spielen nicht nur bei Infektionskrankheiten eine Rolle, die z.B. durch *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* oder *Aspergillus fumigatus* (Serbina et al. 2008) ausgelöst werden, sondern beispielsweise auch bei Tumorerkrankungen. Auch bei diesem Krankheitsbild werden seit einigen Jahren auch unreife Zellen beschrieben, die sich im umgebenden Tumorgewebe anhäufen und das Tumorstadium fördern. Im folgenden Abschnitt wird im Detail auf diesen immunsuppressiven Zelltyp eingegangen.

## 1.5 Myeloide Suppressorzellen

Bereits vor über 25 Jahren wurden Zellen aus dem Knochenmark beschrieben, die eine Immunantwort gegen Tumore supprimieren können (Young et al. 1987). Diese suppressiven Zellen rückten in den vergangenen Jahren in den Mittelpunkt vieler Forschungsprojekte und sind heute besser unter dem Namen myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells* = MDSC) bekannt. Die Zellpopulation der MDSCs besteht aus einer heterogenen Zusammensetzung aus unreifen myeloiden Zellen des Knochenmarks. Der Phänotyp einer murinen myeloiden Suppressorzelle ist die Expression des Integrins CD11b und dem Granulozyten-Differenzierungsantigen Gr-1. Da manche Antikörper gegen Gr-1 (z.B. Klon RB6-8C5) nicht zwischen den beiden Epitopen Ly6C (Lymphozyten Antigen 6C) und Ly6G (Lymphozyten Antigen 6G) unterscheiden kann (Ritter et al. 2009; Schmid et al. 2012),

wurden erst nach der Entwicklung spezifischer Antikörper gegen diese Epitope zwei Subtypen von MDSCs charakterisiert: einen Monozyten-ähnlichen Phänotyp mit dem Oberflächenprofil  $CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^{high}$  (Mo-MDSC = *monocytic MDSC*) und einen Granulozyten-ähnlichen Subtyp mit dem Expressionsmuster  $CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{low}$  (PMN-MDSC oder G-MDSC = *polymorphonucleated MDSC* bzw. *granulocytic MDSC*) (Abb.1.2 Gabrilovich und Nagaraj 2009).



**Abb. 1.2: Die MDSC-Subtypen.**  $CD11b^+ Gr-1^+$  MDSCs können in zwei Gruppen unterteilt werden: Monozyten-ähnliche MDSCs und PMN-MDSCs. Diese können eine T-Zellproliferation mit verschiedenen Mechanismen hemmen. Mo-MDSCs vermitteln ihre Suppression überwiegend über stickoxidabhängige Mechanismen, PMN-MDSCs durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (übernommen und abgeändert aus Gabrilovich und Nagaraj 2009).

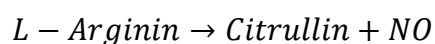
Myeloide Suppressorzellen akkumulieren stark im Gewebe, das den Tumor umgibt. Diese Anhäufung der MDSCs wird darauf zurückgeführt, dass Tumorzellen vermehrt Faktoren freisetzen, die eine gesteigerte Neubildung von myeloiden Vorläuferzellen bewirken. Dazu zählen Wachstumsfaktoren wie *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) oder *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF), sowie Prostaglandine und der *stem cell factor* (SCF) (Gabrilovich et al. 2012). Auf diese Weise kann der Tumor die Anhäufung von unreifen myeloiden Zellen begünstigen. Im umgebenden Tumorgewebe wird auch CCL2 exprimiert, allerdings liegt das Chemokin hier in einer nitrierten Form vor.  $CCR2^+$  myeloide Suppressorzellen können diese veränderte Form erkennen und werden zum

Tumor rekrutiert. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die auch über CCR2 zum Entzündungsort wandern können, sind nicht mehr in der Lage auf das veränderte CCL2 zu reagieren. Diese selektive Migration von myeloiden Vorläuferzellen begünstigt dadurch das Tumorstadium (Gabrilovich et al. 2012).

Mit welchen molekularen Mechanismen MDSCs eine T-Zellproliferation hemmen können, wird im folgenden Abschnitt erklärt.

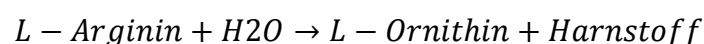
### 1.5.1 Molekulare Mechanismen der Suppression

Sowohl Mo-MDSCs als auch PMN-MDSCs sind in der Lage proliferierende T-Lymphozyten zu supprimieren. Dabei wurden mehrere Mechanismen beschrieben. Die gleichzeitige Expression der Enzyme Arginase-1 und iNOS sowie die Bildung von ROS führt zu einer gehemmten T-Zellproliferation. iNOS ist das wichtigste Enzym zur Bildung von NO, das durch folgende Reaktion entsteht (MacMicking et al. 1997):



NO hat sehr weitreichende Auswirkungen im Körper. Zum einen wirkt es über zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), was zu einer Vasodilatation der Blutgefäße führt und beeinflusst dadurch den Blutdruck erheblich. Diese Wirkung wird auch medizinisch genutzt, zum Beispiel bei Herzinfarkt-Patienten, damit sich die Herzkranzgefäße wieder entspannen (Walter et al. 1988). Für Leukozyten ist NO vor allem zur Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen von Bedeutung (MacMicking et al. 1997; siehe 1.3). In MDSCs kann diese schützende Funktion des NO zu einem immunsuppressiven Effekt führen, denn es führt in T-Zellen zu einer Hemmung des Januskinase-3 (JAK3)/ STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-5 Signalwegs und zur Apoptose von T-Zellen (Gabrilovich und Nagaraj 2009).

Ein weiteres Enzym, das mit den suppressiven Eigenschaften von MDSCs in Verbindung gebracht wird, ist Arginase-1. Es wird sowohl in Leberzellen als auch in Leukozyten produziert und katalysiert die Reaktion:



Diese Reaktion stellt den letzten Schritt des Harnstoffzyklus in Hepatozyten dar (Wu und Morris 1998). Aber auch in myeloiden Zellen wurde Arginase-1 nachgewiesen. Der Mechanismus, den MDSCs durch eine erhöhte Arginase-1 Produktion ausnutzen, ist die

verminderte Verfügbarkeit von L-Arginin im umgebenden Gewebe. Dieser Mangel an L-Arginin führt zu einer reduzierten Proliferation von T-Zellen, einer verringerten Expression der CD3  $\zeta$ -Kette des T-Zellrezeptors und es wird verhindert, dass T-Zellen die Zellzyklus Regulatoren Cyclin D3 und cyclinabhängige Kinase 4 bilden (Gabrilovich und Nagaraj 2009).

Der dritte beschriebene suppressive Effekt von myeloiden Suppressorzellen wird durch ROS erzielt. Zu den physiologisch reaktivsten Stoffen im Organismus gehört unter anderem Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), das aus NO und  $\text{O}_2^-$  gebildet wird. Peroxynitrit ist in der Lage bestimmte Aminosäuren zu nitrosylieren (z.B. Cystein, Methionin, Tryptophan oder Tyrosin) (Gabrilovich und Nagaraj 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass  $\text{CD8}^+$  T-Zellen, die Nitrotyrosin aufweisen, nicht mehr aktivierbar sind. Dadurch wird die adaptive Immunantwort geschwächt. MDSCs können auch indirekt zu einer gehemmten Immunantwort beitragen, indem sie regulatorische T-Zellen ( $\text{T}_{\text{Reg}}$ ) vermehrt rekrutieren (Gabrilovich und Nagaraj 2009). Diese immunsuppressiven T-Zellen sind seit längerem bekannt und können durch IL-10, *transforming growth factor* (TGF)  $-\beta$  und über zell-zellkontaktabhängige Mechanismen T-Zellimmunreaktionen abschwächen (Sakaguchi et al. 2010).

### 1.5.2 Myeloide Suppressorzellen bei weiteren Krankheitsbildern

Ursprünglich wurden MDSCs in Tumormodellen beschrieben (siehe 1.5), doch es gibt auch Hinweise auf deren Existenz in anderen Krankheitsbildern wie bakteriellen Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* oder *Listeria Monocytogenes*, Infektionen mit Parasiten (*Trypanosoma Cruzi*) oder Helminthen (Gabrilovich und Nagaraj 2009). Durch die Infektion mit *Listeria monocytogenes* wurden myeloide Zellen verstärkt zur Infektionsstelle rekrutiert, die den Phänotyp unreifer Monozyten aufwiesen (Sunderkötter et al. 2004). In einer humanen Studie wurde veröffentlicht, dass myeloide Suppressorzellen in Patienten mit Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*) sowohl im Blut als auch in der Lunge verstärkt auftreten (Du Plessis et al. 2013). Nicht nur in bakteriellen Infektionsmodellen, auch bei Autoimmunerkrankungen wie dem murinen Modell des Morbus Crohn wurde eine bedeutende Rolle von MDSCs nachgewiesen (Haile et al. 2008). Während sich die Prozesse des Morbus Crohn im gastrointestinalen Trakt abspielen, wurde im Mausmodell der multiplen Sklerose (experimentelle autoimmun Encephalomyelitis, EAE), eine Autoimmunreaktion gegen Nervenzellen, gezeigt, dass MDSCs den Krankheitsverlauf verstärken können (Yi et al. 2012).

Bei Infektionskrankheiten mit Parasiten, wie beispielsweise *Leishmania donovani*, wurde gezeigt, dass diese intrazellulären Parasiten im Knochenmark die Produktion des GM-CSF Gehalts erhöhen. Dadurch wird die Bildung neuer unreifer myeloider Vorläuferzellen, wozu MDSCs zählen, gefördert (van Ginderachter et al. 2010). Am Infektionsherd kommen MDSCs mit Zytokinen in Kontakt, wie z.B. IL-4 oder IFN $\gamma$ , die die Funktionalität von MDSCs beeinflussen können. Das von aktivierten T-Zellen produzierte IFN $\gamma$  ist beispielsweise für die suppressive Funktionalität von MDSCs nötig (Gabrilovich und Nagaraj 2009; Schmid et al. 2012; Greifenberg et al. 2009).

Durch eine Infektion mit dem Helminthen *Schistosoma mansoni* zeigten sich vergleichbare Entwicklungen im Knochenmark. Auch in der Milz wurden Faktoren identifiziert, die eine Myelopoese (d.h. die Neubildung myeloider Zellen) außerhalb des Knochenmarks begünstigen, wie z.B. IL-3. Diese Expansion von unreifen myeloiden Zellen konnte auch in weiteren parasitären Infektionskrankheiten beobachtet werden, wie z.B. *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) oder dem Malaria Erreger *Plasmodium chabaudi* (van Ginderachter et al. 2010). Nicht nur extramedulläre Myelopoese, sondern auch die Migration von MDSCs zum Infektionsort wurde in Mausmodellen der Toxoplasmose (*Toxoplasma (To.) gondii*) nachgewiesen. In der frühen Phase der Infektion wurde NO als der dominierende Faktor für die Suppression in *To. gondii* infizierten Lungen, *T. cruzi* infizierten Milzen und im Peritoneum von *Taenia crassiceps* (Bandwurm) befallenen Mäusen identifiziert (van Ginderachter et al. 2010). In Fällen mit chronischen Krankheitsverläufen, wurde bei *T. brucei* und *To. gondii* Infektionen gezeigt, dass die suppressiven Eigenschaften NO-unabhängig wurden und sich überwiegend Arginase-1-abhängige suppressive Mechanismen entwickelt haben (van Ginderachter et al. 2010). Auch während einer Leishmanieninfektion wurde eine Arginase-1-abhängige Regulation des Krankheitsverlaufs festgestellt (Modolell et al. 2009). Es werden zwar myeloide Zellen beschrieben, die vermehrt während einer Leishmaniose auftreten und *ex vivo* eine T-Zellproliferation hemmen können, doch es bleibt zu klären, inwiefern diese Zellen *in vivo* den Krankheitsverlauf beeinflussen. Da in der vorliegenden Arbeit das experimentelle Modell der Leishmaniose das zentrale Infektionsmodell war, wird im nächsten Abschnitt die Leishmaniose detailliert dargestellt.

## **1.6 Die Leishmaniose**

### **1.6.1 Taxonomie**

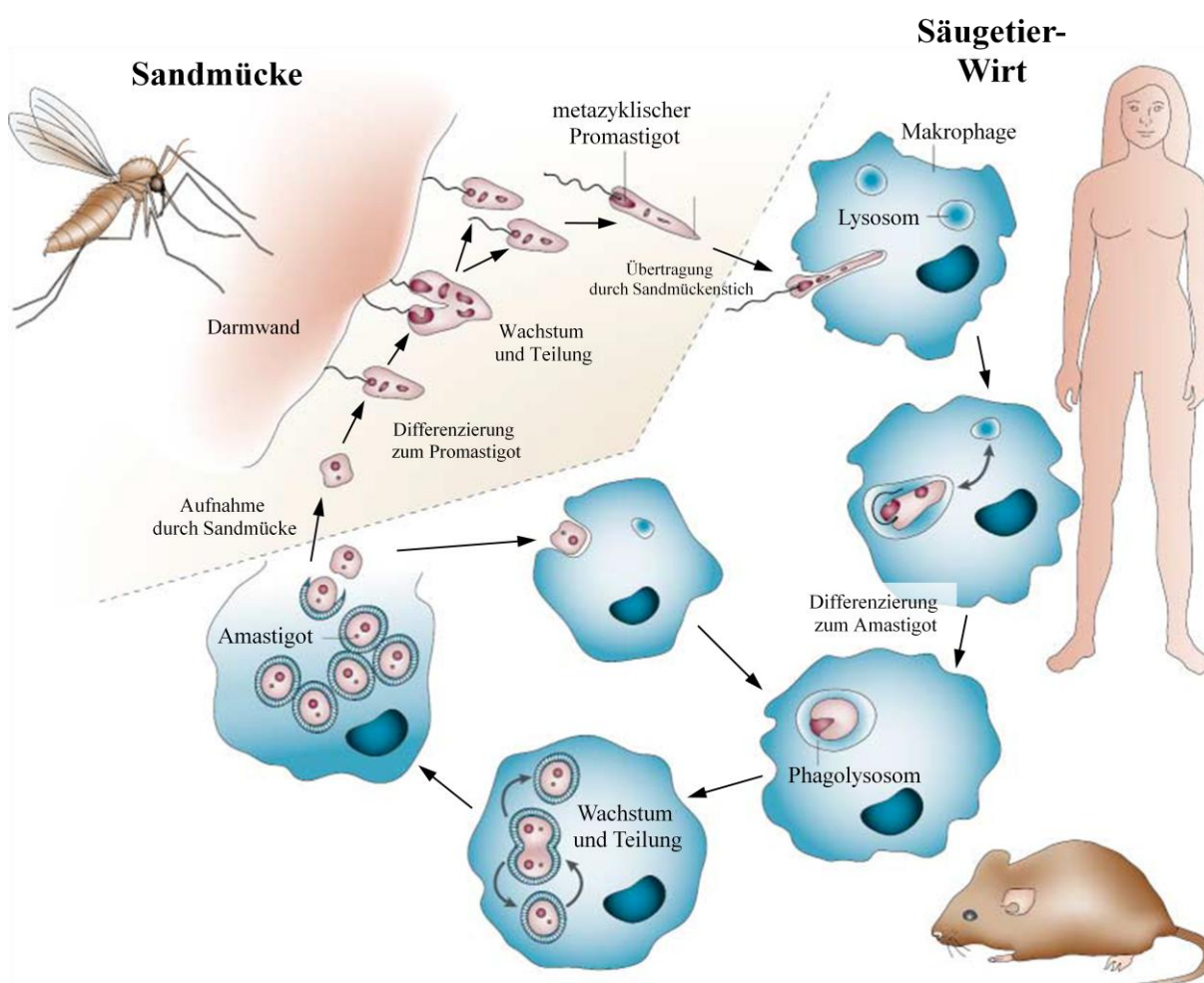
Leishmanien werden der Gruppe der *Kinetoplastea* zugeordnet. Diese begeißelten Protozoen werden aufgrund eines Organells, dem sog. Kinetoplast (mitochondriale DNA), der in der Nähe des Flagellums lokalisiert ist, charakterisiert (Maslov et al. 2001). Die Unterordnung davon, die *Trypanosomatidae*, wird weiterhin in 11 Gattungen unterteilt, zu denen unter anderem Leishmanien, Trypanosomen und Leptomonas zählen. Alle *Trypanosomatidae* sind parasitär und einige durchlaufen einen Wirtswechsel während ihres Lebenszyklus (siehe Abb. 1.3 und 1.6.2). In der Gattung *Leishmania* gibt es rund 20 humanpathogene Leishmanienarten. Dabei können die verschiedenen Arten unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen. Die viszerale Leishmaniose stellt die schwerwiegendste Form der Leishmaniose dar, die unter anderem durch die Arten *Leishmania (L.) donovani* und *L. infantum* ausgelöst wird. Die mukokutane Leishmaniose wird überwiegend durch die Arten *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* oder *L. amazonensis* verursacht. Hingegen wird die kutane Leishmaniose meist durch *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* oder *L. peruviana* hervorgerufen. Die verschiedenen Krankheitsbilder werden in 1.6.3 genauer behandelt. Nachfolgend wird der Lebenszyklus von Leishmanien beschrieben (Kato et al. 2010).

### 1.6.2 Lebenszyklus der Leishmanien

Alle Leishmanienarten führen einen dimorphen Lebenszyklus, der einen Wirtswechsel vom Insektenvektor zum Säugetierwirt beinhaltet (siehe Abb. 1.3). Übertragen werden die Parasiten von Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* (in Asien, Afrika und Europa) sowie *Lutzomyia* und *Psychodopygus* (in Nord und Südamerika). Dabei wird die sogenannte promastigote Form der Leishmanien, die im Insektenvektor vorherrscht, auf den Säugetierwirt übertragen (Stebut et al. 2012). Promastigote Leishmanien zeichnen sich durch eine längliche Morphologie und ein Flagellum aus. Nach der Infektion des Wirtsorganismus werden die promastigoten Leishmanien durch Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und phagozytiert. Es wird angenommen, dass Leishmanien zunächst von neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden, die daraufhin absterben und anschließend von Makrophagen beseitigt werden. Dadurch entgeht der Parasit einer Aktivierung des Immunsystems und gelangt so in die Zelle in der Leishmanien replizieren und differenzieren (Ritter et al. 2009). Die aufgenommenen Parasiten entwickeln sich in den Phagolysosomen von Makrophagen zur amastigoten Form, die sich durch eine kugelige Morphologie und das Fehlen eines sichtbaren Flagellums auszeichnet. Außerdem sind amastigote Leishmanien resistenter gegen die Abwehrmechanismen der Makrophagen. In der amastigoten Form wird

nach erfolgreicher Phagozytose durch Makrophagen das Enzym NADPH-Oxidase in geringerem Maße aktiviert, als nach einer Phagozytose von promastigoten Leishmanien. Des Weiteren sind Leishmanien unter amastigoten Bedingungen (d.h. ein pH-Wert von 5,5 und Temperaturen von 37°C) resistenter gegenüber ROS, wie  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot NO$  und  $ONOO^{\cdot}$ . Amastigote Leishmanien sind in der Lage die  $\cdot NO$  Produktion in aktivierten Makrophagen zu reduzieren, was für die intrazelluläre Replikation förderlich ist. Dieser Effekt wird auf Lipophosphoglykan (LPG) zurückgeführt, einem Molekül das auf der Oberfläche von Leishmanien vorhanden ist (van Assche et al. 2011).

Wird der infizierte Wirt erneut von einer Sandmücke gebissen, werden amastigote Leishmanien bei der Blutmahlzeit aufgenommen, die innerhalb von 7 Tagen in die infektiöse metazyklische promastigote Form weiterdifferenzieren und den Lebenszyklus abschließen (siehe Abb. 1.3).



**Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Lebenszyklus der Leishmanien.** Sandmücken der Gattung *Phlebotomus* sind die Überträger der Leishmanien. Die metazyklischen promastigoten Parasiten infizieren nach einem Mückenbiss Phagozyten und entwickeln sich zur amastigoten Form. Nach einer Replikationsphase können die amastigoten Parasiten durch einen erneuten Mückenbiss in den Vektor

gelangen und der Lebenszyklus ist abgeschlossen (übernommen und abgeändert aus Sacks und Noben-Trauth 2002).

### 1.6.3 Die Leishmaniose des Menschen

Wie in 1.6.1 bereits erwähnt gibt es 3 verschiedene Formen der Leishmaniose: die kutane Leishmaniose, die sich hauptsächlich auf die Haut beschränkt; die mukokutane Leishmaniose die neben den dermalen Hautpartien auch die Schleimhäute betrifft; und die oft tödlich verlaufende viszerale Leishmaniose. Jährlich entwickeln 1,5 - 2 Millionen Menschen eine Leishmaniose (Murray et al. 2005). Laut WHO ist die Leishmaniose in 88 Ländern verbreitet und es starben im Jahr 2011 weltweit 53.675 Menschen an den Folgen einer Leishmanieninfektion. Damit ist die Leishmaniose, nach Malaria mit fast 600.000 Toten, an zweiter Stelle der durch Parasiten verursachten tödlichen Krankheiten (siehe [www.who.int](http://www.who.int)).

90% der kutanen Leishmaniosefälle treten in Afghanistan, Pakistan, Syrien, Saudi-Arabien, Algerien, Iran, Brasilien und Peru auf (Murray et al. 2005). Bei der kutanen Leishmaniose werden die Parasiten in der Haut zunächst von Makrophagen aufgenommen und können sich vermehren, ohne eine starke Immunantwort auszulösen. Erst nach einigen Wochen werden Symptome bemerkbar, wie die Bildung von Papeln, die weiter ulzerieren können. Im Zentrum des Ulkus bildet sich oft eine Kruste und durch Superinfektionen durch Bakterien oder Pilze kann die Infektionsstelle schmerzen. Nach durchschnittlich 6-12 Monaten kommt es unter Bildung einer Narbe zur Abheilung der Infektion (Stebut et al. 2012). Die kutane Leishmaniose, die durch *L. major* oder *L. tropica* ausgelöst wurde, heilt ohne Behandlung nach mehreren Monaten ab. Wenn der Heilungsprozess zu lange dauert, die Hautläsion zu groß wird (4 – 5 cm) oder eine Ausbreitung verhindert werden soll (siehe mukokutane Leishmaniose), sollte eine Therapie eingeleitet werden. Für die kutane Leishmaniose ist eine parenterale Gabe von Antimonpräparaten die wirksamste Behandlungsmethode (Murray et al. 2005). Dennoch ist diese Form der Therapie teuer und schädigt auch den Patienten, da Antimonmedikamente toxisch sind und starke Nebenwirkung mit sich bringen, wie z.B. erhöhte Amylase/Lipase-Werte sowie Veränderungen im Leber-Funktions-Test (Murray et al. 2005).

Wenn eine kutane Leishmaniose unbehandelt bleibt, kann es in seltenen Fällen zu einer besonderen Form der Leishmaniose kommen: die mukokutane Leishmaniose. Diese entsteht, wenn sich vom primären Infektionsort Leishmanien (hauptsächlich *L. braziliensis* und *L.*



*amazonensis*) in die Schleimhäute ausbreiten. Dabei kann die Krankheit noch Jahre nach der ersten Leishmanieninfektion auftreten. Auch bei einer mukokutanen Infektion kann eine parenterale Antimontherapie zum Erfolg führen. Als Ersatzbehandlung würde eine Amphotericin B-Gabe in Frage kommen. Auch Amphotericin B hat jedoch schwere Nebenwirkungen, wie beispielsweise hohes Fieber (über 41°C), erniedrigter Blutdruck, akute Thrombosen, Nierenschädigungen, Anämie oder Leberentzündungen (Blum und Hatz 2009). Im Gegensatz zur kutanen Leishmaniose, ereignen sich 90% der viszeralen Leishmaniosefälle (auch Kala-Azar genannt) in Indien, Bangladesch, Nepal, Sudan und in Brasilien (Murray et al. 2005). Die ersten Symptome einer viszeralen Leishmaniose sind Fieber, Schwäche, nächtliche Schweißausbrüche, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust, welche über Wochen und Monate anhalten können. Im weiteren Verlauf bilden sich eine Hepatomegalie und eine Splenomegalie (siehe Abb. 1.4), die bei unbehandelten Patienten tödlich enden können. Neben der Standardtherapie bei Leishmaniosepatienten mit Antimonpräparaten wird bei der viszeralen Leishmaniose und antimonresistenten Infektionen, als Alternative Miltefosin angewendet. Die Nebenwirkungen dieses Medikaments sind Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Durchfall, allerdings kann es oral verabreicht werden (Blum und Hatz 2009).



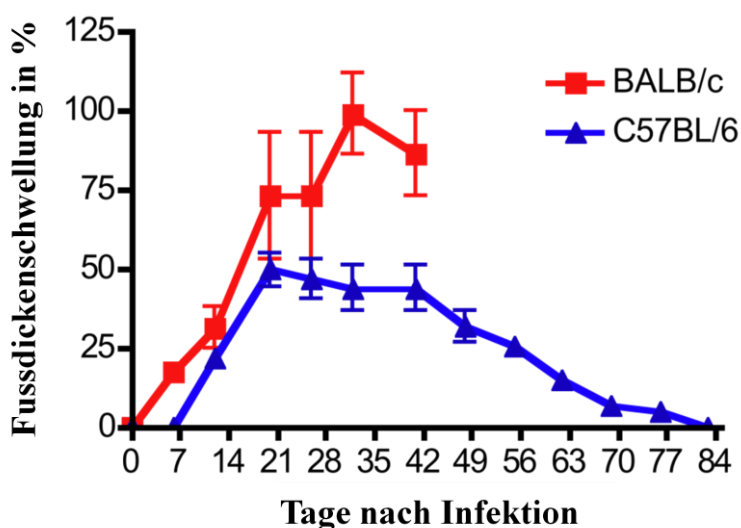
**Abb. 1.4: Patienten mit Leishmaniosesymptomen.** Kutane Leishmaniose (links) mit Bildung einer großen Hautläsion (*L. panamensis*, Kolumbien). Viszerale Leishmaniose mit Hepatosplenomegalie (Indien) (Beide Bilder sind aus Murray et al. 2005 übernommen und durch Elsevier genehmigt).

Da viele der beschriebenen Therapien schwerwiegende Nebenwirkungen haben und sehr teuer sind, ist es von großer Bedeutung, die Mechanismen der Parasiten und deren Interaktionen mit dem Immunsystem zu verstehen. Die bisherigen Erkenntnisse über die Leishmaniose und

deren Krankheitsbild wurde maßgeblich im Mausmodell erforscht, die im Folgenden erläutert wird.

#### **1.6.4 Das experimentelle Modell der Leishmaniose in der Maus**

In den letzten Jahrzehnten hat das experimentelle Mausmodell der Leishmaniose dazu beigetragen, die molekularen Mechanismen der Immunantwort gegen eine Infektion mit Parasiten besser zu verstehen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit *L. major* gearbeitet und wird deshalb im Folgenden beschrieben. Für eine erfolgreiche Leishmanieninfektion in der Maus werden  $3 \times 10^6$  *L. major*-Parasiten subkutan in die Hinterpfoten injiziert. Hier ist zu beachten, dass verschiedene *L. major* Stämme unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen können. Der Leishmanienstamm MHOM/IL/80/Friedlin ruft eine schwächere Immunantwort und Pathologie hervor als der Stamm MHOM/IL/81/BNI, der in dieser Arbeit verwendet wurde (Ritter et al. 2004). Neben den verschiedenen Leishmanienstämmen hat vor allem der genetische Hintergrund der Maus großen Einfluss auf den Verlauf der Krankheit. C57BL/6-Mäuse können während einer Leishmanioseinfektion eine schützende  $T_H1$ -Immunantwort generieren (siehe auch 1.2), die es erlaubt die Replikation der Parasiten zu kontrollieren. BALB/c-Mäuse hingegen sind nicht in der Lage, die Infektion effektiv zu bekämpfen, was überwiegend auf die  $T_H2$ -Immunantwort zurückzuführen ist. Dadurch entwickelt sich ein chronischer Krankheitsverlauf. Als messbare Größe, die Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf zulässt, wird dabei die Schwellung der Pfoten herangezogen. Während Pfoten von C57BL/6-Mäusen nach einer initialen Schwellung schnell wieder den Normalzustand erreichen (größte Schwellung nach ca. 3 Wochen), können BALB/c-Mäuse die massive Vermehrung der Parasiten nicht verhindern. Nach 4-5 Wochen entwickeln BALB/c-Mäuse eine Gewebnekrose. In diesem Zustand müssen die Tiere aus tierschutzrechtlichen Gründen aus dem Experiment genommen werden (siehe Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Krankheitsverlauf der experimentellen Leishmaniose.** Die berechnete Fußdicke wurde auf die Dicke eines naiven Fußes relativiert und es ergibt sich der prozentuale Anstieg der Fußschwellung. BALB/c Mäuse (rot) entwickeln eine massive Schwellung, C57BL/6-Mäuse (blau) können die Krankheit kontrollieren. (Grafik übernommen und abgeändert aus Jirillo E. und Brandonisio O. 2010).

Auf molekularer Ebene wurde gezeigt, dass resistente Mäuse, die eine starke  $T_H1$ -Immunantwort generieren können, ebenfalls eine chronische Leishmaniose entwickeln, wenn das Zytokinprofil einer  $T_H2$ -Immunantwort vorhanden ist. Gentechnisch veränderte Mäuse, die entweder IL-10 oder IL-13 ( $T_H2$ ) überexprimieren, können den Verlauf der Leishmaniose nicht kontrollieren, was auf eine gehemmte Makrophagenaktivierung durch IL-10 bzw. IL-13 zurückzuführen ist (Sacks und Noben-Trauth 2002). Derselbe Phänotyp wurde beobachtet, wenn  $T_H1$  Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF) durch genetische Manipulation zerstört wurden. Es entwickelt sich eine  $T_H2$  dominierte Immunantwort, die in einem chronischen Krankheitsverlauf resultiert (Sacks und Noben-Trauth 2002). Ein weiterer entscheidender Faktor, der das Krankheitsbild der Leishmaniose prägt, ist die Aktivität von myeloiden Zellen am Infektionsort.

### 1.6.5 Die Immunantwort gegen *Leishmania major*

Die Leishmaniose entwickelt sich nach Übertragung durch Sandmücken in die Haut. Die anschließende Immunreaktion des Wirts gegenüber dem Parasiten kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden. In der frühen ersten Phase (4-5 Wochen nach Beginn der Infektion), die auch „stille Phase“ genannt wird, phagozytieren neutrophile Granulozyten und Makrophagen des angeborenen Immunsystems die Leishmanien. Da neutrophile

Granulozyten die ersten Phagozyten sind, die zum Infektionsort rekrutiert werden, stellen sie neben Makrophagen die ersten Wirtszellen für die intrazellulären Protozoen dar. Erwähnenswert ist hier, dass neutrophile Granulozyten die Parasiten zwar phagozytieren können, aber nicht in der Lage sind sie abzutöten. Vielmehr stirbt der infizierte Granulozyt nach wenigen Tagen durch Apoptose und wird anschließend von Makrophagen aufgenommen. Dieser Mechanismus wird für Leishmanien beschrieben, um ohne Aktivierung des Immunsystems in die Zielzelle, den Makrophagen, zu gelangen (van Zandbergen et al. 2004). Unterstützt werden die Phagozyten dabei durch das Komplementsystem. Die Faktoren C3bi und C3b opsonisieren dabei die Leishmanien und werden durch den Komplementrezeptor C3 auf den Makrophagen erkannt, was in einer erhöhten Phagozytose resultiert (Reiner und Locksley 1995; Stebut 2007). Diese verstärkte Phagozytose hat aber nicht nur positive Effekte für den Wirt, auch der Parasit ist darauf angewiesen, in den Makrophagen zu gelangen, da er sich nur dort vermehren kann. Intrazellulär entwickeln sich nach 12 - 24 Stunden im Phagolysosom aus der promastigoten Form amastigote Leishmanien. In diesem unbegeißelten Zustand ist nach der Phagozytose der Leishmanien die Produktion von Superoxid-Radikalen ( $O_2^{\bullet-}$ ) in Makrophagen geringer als bei der begeißelten promastigoten Form. Die amastigote Phase der Leishmanien ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben der Parasiten in den Makrophagen, da promastigote Leishmanien nur im Phagolysosom eine Verringerung der  $O_2^{\bullet-}$ -Produktion hervorrufen, amastigote dagegen verursachen diesen Effekt in der ganzen infizierten Zelle (van Assche et al. 2011). In der anschließenden Phase, die etwa 6 Wochen nach der Infektion beginnt, häufen sich dendritische Zellen am Infektionsort an. Mit dieser Phase geht auch ein Anstieg an IL-12 und die Rekrutierung von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Effektorzellen einher (Stebut 2007). Im Gegensatz zu Makrophagen können dendritische Zellen nur die amastigote Form der Leishmanien phagozytieren und für die Antigenpräsentation prozessieren. Dieser Unterschied erklärt auch die späte Anhäufung der dendritischen Zellen, da sich erst nach mehreren Wochen eine Leishmaniose mit ausschließlich amastigoten Leishmanien entwickelt. Daraufhin aktivieren dendritische Zellen sowohl über MHC Klasse-I als auch MHC Klasse-II  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  T-Zellen (Stebut 2007). Wie bereits in 1.6.4 beschrieben, kann sich daraufhin eine  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -vermittelte Immunantwort entwickeln, was den Verlauf der Krankheit maßgeblich beeinflusst.

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Myeloide Zellen spielen bei der Immunantwort gegen den obligat intrazellulären Parasiten *Leishmania major* eine zentrale Rolle. Am Infektionsort können myeloide Zellen, die zur Phagozytose befähigt sind den Parasiten aufnehmen. Besonders Makrophagen stellen wichtige Wirtszellen dar, in denen sich die Parasiten vermehren können. Dendritische Zellen sind in der Lage als sogenannte professionelle antigenpräsentierende Zellen eine adaptive T-Zellantwort im drainierenden Lymphknoten der Haut zu initiieren. Ob es zur Ausbildung einer protektiven Immunantwort kommt, hängt stark von dem genetischen Hintergrund der Versuchstiere ab. So kommt es bei C57BL/6-Mäusen zur Entwicklung einer T<sub>H</sub>1-Antwort. Bei dieser adaptiven Immunantwort sezernieren T<sub>H</sub>1-Zellen IFN $\gamma$ , welches infizierte Makrophagen zur Abtötung der intrazellulären Parasiten anregen kann (Stebut 2007; León et al. 2007). Bei BALB/c-Mäusen fehlt die Etablierung einer fulminanten T<sub>H</sub>1- Immunantwort. Der Krankheitsverlauf verläuft chronisch (Sacks und Noben-Trauth 2002).

Während einer Leishmaniose werden aus dem Blutkreislauf kontinuierlich Monozyten zum Entzündungsort rekrutiert, die zu DCs oder Makrophagen differenzieren können (León et al. 2007). Es ist auch bekannt, dass unreife myeloide Zellen in der Lage sind, *in vitro* eine T-Zellproliferation zu hemmen. Diesen als myeloide Suppressorzellen (MDSC) bekannten Zelltypen wird zugeschrieben, bei Tumorerkrankungen eine anti-Tumor Immunreaktion zu supprimieren (Gabrilovich und Nagaraj 2009; Gabrilovich et al. 2012). Über die Existenz bzw. Relevanz der MDSCs bei einer adaptiven T-Zellantwort gegen Leishmanien ist wenig bekannt (Schmid et al. 2012; van Ginderachter et al. 2010; Pereira et al. 2011). Ebenso gibt es keine vergleichenden Studien, die sich mit der Bedeutung von MDSCs bei unterschiedlichen Immunreaktionen in C57BL/6- bzw. BALB/c-Mäusen beschäftigt.

Daher stellten sich die folgenden Fragen zur Charakterisierung von MDSCs während einer Leishmanieninfektion:

1. Können MDSCs während einer Leishmanieninfektion identifiziert werden und gibt es Unterschiede zwischen C57BL/6- und BALB/c-Mäusen?
2. Ist der Parasit *L. major* in der Lage die Funktionalität einer myeloiden Suppressorzelle zu verändern?
3. Lässt sich durch eine Depletion myeloider Zellen der Verlauf einer Leishmaniose in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen verändern?

4. Wie entwickelt sich eine Leishmaniose in C57BL/6-Mäusen, deren MDSCs keinen CCR2-Chemokinrezeptor exprimieren und somit nicht zum Infektionsort migrieren können?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1. Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Bestrahlungsgerät Linearbeschleuniger Primus 1	Siemens, München
CO <sub>2</sub> Inkubator für Leishmanienkulturen	Memmert GmbH + Co KG, Schwabach
Durchflusszytometer LSRII	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA Microplate– Reader	Molecular Devices, Ismaning
FACS Aria	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Imager.M1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München
Fluoreszenzmikroskop – Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München
Fußdicken – Messgerät	Kroeplin GmbH, Schlüchtern
Heizblock	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
iCycler iQ™5	Bio-Rad, München
Implen Nano Photometer	Implen, München
Inkubator für Zellkultur Heraeus BBD 6220	Thermo Scientific, München
MyCycler™	Bio-Rad, München
Neubauer-Zählkammer für Leishmanien (Tiefe 20µm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer für Zellen (Tiefe 100µm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipetten (100 - 1000µl; 10 - 100µl; 2 - 20µl; 0,2 - 2µl)	Thermo Scientific, München
Sterile Arbeitsbank (Hera Safe)	Thermo Scientific, München
Thermomixer	A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Wärmeschränk	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen: Centrifuge 5810 R, 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zytozentrifuge Shandon Cytospin 4	Thermo Scientific , München

### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Propanol	Merck, Darmstadt
2',7' – Dichlorofluorescein-diacetat (DCFDA)	Invitrogen, Darmstadt
3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl)nona-2,4,6,8-tetraensäure (all- <i>trans</i> Retinsäure; ATRA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4',6-Diamidino-2'-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5'-Bromdesoxyuridin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
BD Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization Solution	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA Substrat Reagent A und B	BD Biosciences, Heidelberg
BD Perm/Wash Puffer	BD Biosciences, Heidelberg
Brain-Heart-Infusion (BHI) Agar	Institut für medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Regensburg
Brewer Thioglykolat Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	AppliChem, Darmstadt
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Invitrogen, Darmstadt
Cell Lysis Solution	QIAGEN, Hilden
Cohn-II (humane IgG-Fraktion)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Gatersleben
DNase I	Invitrogen, Darmstadt
Ethanol (100 %)	J. T. Baker, Griesheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	PAN Biotech, Aidenbach
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Freund`s Adjuvans	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gemcitabin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutaraldehyd	PAN Biotech, Aidenbach



GM-CSF	Eigenherstellung Institut für Immunologie, Uniklinikum Regensburg (vgl. 2.2.1.7)
IQ™ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
Kaninchen-Vollblut, defibriniert	Charles River, Sulzfeld; Harlan Laboratories U.K. Ltd., Hillcrest, United Kingdom
Kollagenase D	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
L-NIL (hydrochloride)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit	Thermo Scientific, München
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt
Monensin	eBioscience, San Diego
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
nor-NOHA	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Ovalbumin 257-264 (OVA-SIINFELK)	InvivoGen, San Diego
Ovalbumin 323-339 (OVA-ISQAVHAAHAEINEAGR)	InvivoGen, San Diego
Paraformaldehyd 36,5 – 38%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin G-Streptomycin Lösung (100x)	Invitrogen, Darmstadt
PermaFluor™ wässriges Einbettungsmedium	Thermo Scientific, München
Protein Precipitation Solution	QIAGEN, Hilden
Proteinase K	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Rinderserumalbumin (BSA)	PAN Biotech, Aidenbach
Recombinantes Maus CCL2	BioLegend, Fell
Rekombinantes Maus IFN-γ	BioLegend, Fell
Recombinantes Maus IL-4	BioLegend, Fell
Trypanblau (0,2 % in 0,9 % NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

**2.1.3. Medium und Puffer**

Blutagar für Leishmanienkultur:	50 ml defibriniertes Kaninchenblut-Vollblut 50 ml NaCl (0,9% in dH <sub>2</sub> O) 1 x Penicillin G-Streptomycin 200 ml BHI-Agar (52 g/l in dH <sub>2</sub> O)
DPBS (Phosphate Buffered Saline) ohne Magnesium und Calcium	PAN Biotech, Aidenbach
Erythrozyten Lyse Puffer	150mM Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl) 1mM Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> ) 0,1mM Na <sub>2</sub> -EDTA
FACS Fixierungs-Puffer	2% (v/v) FCS 4% (v/v) PFA (Paraformaldehyd) in PBS
FACS-Puffer	2 % (v/v) FCS in PBS
Grieß-Reagenz A	1% Sulfanilamid (w/v), 5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Grieß-Reagenz B	0,1% Naphtyl-Ethylenediamin-Dihydrochlorid
HBSS (Hanks Buffered Salt Solution) mit NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI-1640 L-Glutamin Medium für Leishmanienkultur und Suppressionssassays	10 % (v/v) FCS 100 U / ml Penicillin G 100 U / ml Streptomycin 50 µM 2-Mercaptoethanol in RPMI-1640 (PAN Biotch, Aidenbach, Deutschland)
RPMI-1640 L-Glutamin Medium für die Generierung von <i>in vitro</i> BMDCs und MDSCs	10 % (v/v) FCS 100 U / ml Penicillin G 100 U / ml Streptomycin 50 µM 2-Mercaptoethanol in RPMI-1640 10% (v/v) GM-CSF (siehe 2.2.1.9)

Waschpuffer für ELISA und Histologie	0,05 % (v/v) Tween20 in PBS
--------------------------------------	-----------------------------

### 2.1.4 Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Konzentration	Verdünnung	Isotyp	Firma
anti-Arginase-1	unkonjugiert	19/Aginase I	0,25mg/ml	1:1000	Mouse IgG1	BD Biosciences
B220	Biotin	RA3-6B2	0,5 mg/ml	1:800	Rat IgG <sub>2a</sub>	eBioscience
B220	AF647	RA3-6B2	0,2 mg/ml	1:200	IgG <sub>2a</sub>	eBioscience
B220	PE	RA3-6B2		1:200	IgG <sub>2a</sub>	AbD Serotec
CCR2	FITC	475301	0,05 mg/ml	1:10	IgG <sub>2b</sub>	R&D Systems
CD11b	FITC	M1/70	0,2 mg/ml	1:200	Rat IgG <sub>2b</sub>	BD Biosciences
CD11b	PE	M1/70	0,2 mg/ml	1:1000	Rat IgG <sub>2b</sub>	eBioscience
CD11b	Biotin	M1/70	0,5 mg/ml	1:200	Rat IgG <sub>2a</sub>	Fitzgerald Industries International
CD11b	AF647	M1/70	0,2 mg/ml	1:400	IgG <sub>2b</sub>	eBioscience
CD11c	PE	HL3	0,2 mg/ml	1:100	Armenian Hamster IgG	BD Biosciences
CD3	PE	17A2	0,2 mg/ml	1:200	Rat IgG <sub>2b</sub>	BioLegend
CD4	eF450	RM4-5	0,2 mg/ml	1:800	IgG <sub>2a</sub>	BD Biosciences
CD4	AF647	GK1.5	0,2 mg/ml	1:200	IgG <sub>2b</sub>	eBioscience
CD40	FITC	HM40-3	0,5 mg/ml	1:800	Armenian Hamster IgM	eBioscience
CD44	APC	IM7	0,2mg/ml	1:200	Rat IgG <sub>2b</sub>	eBioscience
CD45	Biotin	30-F11	0,5 mg/ml	1:800	Rat IgG <sub>2b</sub>	eBioscience
CD45.1	Biotin	A20	0,5 mg/ml	1:400	Mouse IgG <sub>2a</sub>	BD Biosciences
CD45.2	FITC	104	0,5 mg/ml	1:200	IgG <sub>2a</sub>	eBioscience
CD62L	PE	MEL-14	0,2 mg/ml	1:300	Rat IgG <sub>2a</sub>	BD Biosciences
CD69	PE	H1.2F3	0,2 mg/ml	1:100	Hamster IgG	eBioscience
CD8	AF647	53-6.7	0,2 mg/ml	1:800	IgG <sub>2a</sub>	BioLegend
CD80	Biotin	16-10A1	0,5 mg/ml	1:200	Armenian Hamster IgG	BD Biosciences
CD86	FITC	GL1	0,5 mg/ml	1:100	IgG <sub>2b</sub>	eBioscience
MHC-II	APC	M5/114.15.2		1:10	Rat IgG <sub>2b</sub>	Miltenyi Biotec
MHC-II	FITC	M5/114.15.2	0,08 mg/ml	1:100	Rat IgG <sub>2b</sub>	Miltenyi Biotec
F4/80	AF488	BM8	0,5 mg/ml	1:400	IgG <sub>2a</sub>	BioLegend
F4/80	eF450	BM8	0,2 mg/ml	1:200	IgG <sub>2b</sub>	eBioscience
Ly6C	AF647	ER-MP20	0,05 mg/ml	1:200	IgG <sub>2a</sub>	AbD Serotec
Ly6G	PE	1A8	0,2 mg/ml	1:200	IgG <sub>2a</sub>	BD Biosciences
Ly6G	V450	1A8	0,2 mg/ml	1:200	IgG <sub>2b</sub>	BD Biosciences
Ly6G	AF647	1A8	0,5mg/ml	1:200	IgG <sub>2a</sub>	BioLegend
anti-iNOS	FITC	6/iNOS/NOS Type II	0,25mg/ml	1:200	IgG <sub>2a</sub>	BD Biosciences
anti-Nitrotyrosin	AF488	1A6	0,5mg/ml	1:200	IgG <sub>2b</sub>	Merck Millipore
PNA	Biotin		5mg/ml	1:200		Vector Labs

**Streptavidin-Konjugate**

Streptavidin	Fluorochrom	Konzentration	Verdünnung	Firma
Streptavidin	AF546	2 mg/ml	1:800	Invitrogen
Streptavidin	AF350	2 mg/ml	1:800	Molecular Probes
Streptavidin	FITC	0,5 mg/ml		BD Pharmingen
Streptavidin	PacificOrange	1mg/ml	1:800	Molecular Probes

**Sekundär-Antikörper**

Antikörper	Fluorochrom	Konzentration	Verdünnung	Isotyp	Firma
Goat- $\alpha$ -rabbit	AF546	2mg/ml	1:600	IgG	Molecular Probes
Goat- $\alpha$ -mouse IgG	AF488	2mg/ml	1:500	Keine Angaben	Invitrogen

**ELISA-Detektionsantikörper**

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Firma
anti-IgG1	HRP	1:2000	Invitrogen
anti-IgG2a	HRP	1:2000	BD Pharmingen
anti-IgG2c	HRP	1:2000	Jackson Immuno Research

**2.1.5 Oligonukleotide**

Folgende für die quantitative real-time PCR verwendeten Oligonukleotidsequenzen wurden von Metabion International AG, Martinsried bezogen:

Zielgen	Bezeichnung	Nukleotidsequenz
Maus Arginase-1	Arg-1_Fw	5' – AGT CTG GCA GTT GGA AGC AT – 3'
	Arg-1_Rev	5' – CAT CTG GGA ACT TTC CTT TC – 3'
Maus IDO	IDO_Fw	5' – AGC TGC CAG AAG GTC TGC TGT ATG – 3'
	IDO_Rev	5' – TGC AGG AGA TTC TTT GCC AGC CTC – 3'

Maus iNOS	iNOS_Fw	5' – GCT GTT CTC AGC CCA ACA AT – 3'
	iNOS_Rev	5' – TGC AAG TGA AAT CCG ATG TG – 3'
Maus $\beta$ -Aktin	$\beta$ -Aktin_for	5' – TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A – 3'
	$\beta$ -Aktin_rev	5' – GGA TGC CAC AGG ATT CCA TAC CCA – 3'
Maus GAPDH	mGAPDH_f	5' – AGC TTG TCA TCA ACG GGA AG – 3'
	mGAPDH_r	5' – TTT GAT GRR AGT GGG GTC TCG – 3'
<i>Leishmania major</i> 18S rRNA	ISS1	5' – GCT CCA AAA GCG TAT ATT AAT GCT GT – 3'
	ISRV	5' – TCC TTC ATT CCT AGA GGC CGT GAG T – 3'

### 2.1.6 Glas- und Plastikmaterialien

BD Discardit™ II Spritzen (2 ml, 5 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon Zellkulturplatte mit 96, 48, 24, 12, 6 Vertiefungen, Flachboden und Deckel	BD Biosciences, Heidelberg
BD Falcon™ Zellsieb 40µm	BD Biosciences, Heidelberg
BD Microlance™ 3 Kanülen (0,9 x 40mm und 0,4 x 19mm)	BD Biosciences, Heidelberg
BD Plastipak™ Spritzen (1 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
BD Zellkulturschale 100 x 20 mm	BD Biosciences, Heidelberg
BD Zellkulturschale 60 x 15 mm	BD Biosciences, Heidelberg
Biosphere Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen für Objektträger 24 x 60 mm	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda Königshofen
FACS-Röhrchen, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
FEATHER® Microtom Klinge C35	FEATHER Safety Razor Co., Ltd
Fettstift Dako Pen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Folie für PCR Platten	Thermo Scientific, München
Latex-Kugeln, 6µm	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MACS-Säulen (LS, LD)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nunc Nunclon™ Surface Zellkulturplatten	Thermo Scientific, München

mit 96 Vertiefungen

Nunc Nunclon™ Surface Zellkulturplatten Thermo Scientific, München

mit 96 Vertiefungen, Rundboden

Parafilm®M A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg

Pasteurpipetten aus Glas Brand, Wertheim

PCR-Platten mit 96 Vertiefungen Thermo Scientific, München

Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl) Sarstedt, Nümbrecht

Polysine Objektträger 75 x 25 x 1 mm Thermo Scientific, München

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml) Sarstedt, Nümbrecht

Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) Sarstedt, Nümbrecht

ZYTO-Filterkarten 75 x 25 mm, doppelt A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg  
gelocht 6 mm

### 2.1.7 Mauslinien

Die für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden unter *Specific pathogen-free* (SPF) Bedingungen am Klinikum Regensburg gehalten. Futter (Firma ssniff®) und H<sub>2</sub>O wurden den Tieren *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Es wurden folgende Mauslinien verwendet:

C57BL/6 Janvier S.A.S. (Le Genest-St-Isle, Frankreich)

BALB/c Janvier S.A.S. (Le Genest-St-Isle, Frankreich)

CCR2<sup>-/-</sup> (B6.129S4-*Ccr2*<sup>tm1Ifc</sup>/J) Charles River, Sulzfeld

CD45.1 OT-II TWINCORE – Centre for Experimental and Clinical Infection Research GmbH, Hannover

### 2.1.8 Leishmanien-Stamm

*L. major* (MHOM/IL/81/FE/BNI) Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg

*L. major* (amastigot) Ger van Zandbergen, Paul-Ehrlich-Institut, Langen

### 2.1.9 Software

AxioVision Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München

BD FACSDiva

FlowJo 7.6.3

GraphPad Prism 5.03

ImageJ

IQ5™ Optical System Software 2.0

Microsoft Office 2011

BD Biosciences, Heidelberg

Tree Star Inc., Ashland, USA

GraphPad Software, La Jolla, USA

National Institute of Health, USA

Bio-Rad, München

Microsoft Deutschland GmbH, München

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Herstellung von Blutagarplatten für die Leishmanienkultur

Zur *in vitro* Kultivierung von *L. major*, werden Blutagarplatten benötigt. Hierzu werden zunächst folgende Komponenten vermischt:

25 ml defibriniertes Kaninchen-Vollblut

25 ml NaCl

1 x Penicillin G-Streptomycin

100 ml BHI-Agar

50µl des flüssigen Agars werden pro Vertiefung auf eine vorgekühlte 96-Well Platte pipettiert. Dabei ist zu beachten, dass es sich um Schrägagar handelt, welches nur zu ~50% den Boden einer Vertiefung bedeckt. Nach 4-stündiger Trocknungszeit können die Platten bei 8°C gelagert werden.

#### 2.2.1.2 Leishmanienkultur

Die Leishmanien wurden in RPMI-Vollmedium bei 28° C und 5 % CO<sub>2</sub> auf Blutagarplatten (vgl. 2.2.1.1) kultiviert. Innerhalb von sieben Tagen wachsen die Parasiten auf der agarfreien Fläche in einem Volumen von 190 µl pro Napf zu einer konfluenten Schicht. Je nach Dichte wurden die Leishmanien aus 4 bis 8 Vertiefungen entnommen, in eine Petrischale zu 20 ml RPMI-Vollmedium gegeben und auf einer neuen Blutagarplatte ausgesät.

Um die Virulenz der Parasiten zu erhalten musste im Abstand von etwa sechs Wochen eine BALB/c-Maus mit  $3 \times 10^6$  *L. major* in die rechte Hinterpfote infiziert werden (vgl. 2.2.2.1). Nach vier Wochen wurden die Parasiten aus den Pfoten der Tiere isoliert. Dazu wurde der infizierte Fuß abgetrennt und für 5 Min. in 70% Ethanol desinfiziert. Nach dem Trocknen wurde das Gewebe von den Knochen gelöst, mit einer Schere zerkleinert und durch ein Metallsieb gedrückt. Zur Entfernung von Knochen- und Geweberesten folgte ein Zentrifugationsschritt für 8 Min. bei 1000 rpm und 4° C. Der Überstand, in dem sich die Parasiten befinden, wurde abgenommen, zum Waschen in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 4000 rpm und 4° C für 8 Min. zentrifugiert. Nach Verwerfen



des Überstandes konnte das Pellet in 20 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert werden. Die Parasiten wurden nun auf einer Blutagarplatte in 190µl Medium ausgesät.

Um die Leishmanien *in vivo* oder *in vitro* für Experimente zu verwenden, wurden diese wie folgt aufgereinigt: die aus der 96-Well Platte entnommenen Leishmanien werden mit 50 ml PBS in eine 50 ml Sarstedt Röhre überführt und bei 4000rpm 8 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals in 50ml PBS resuspendiert und der erste Schritt wiederholt (insgesamt 3x). Anschließend wurde die Parasitenzahl in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 20µm, Kammerfaktor:  $5 \times 10^4$ ) bestimmt. Dazu wurde der zu zählende Teil der Leishmanien in einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung fixiert. Nun konnte die Leishmanien-Suspension auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und im Experiment verwendet werden.

#### **2.2.1.3 Herstellung von Leishmanienantigen (SLA)**

Zur Herstellung von löslichem Leishmanienantigen (SLA; *engl.: soluble Leishmania antigen*) wurden promastigote *L. major*-Parasiten aus den Blutagarplatten, wie in 2.2.1.2 beschrieben, entnommen und aufgereinigt. Die Parasitensuspension wurde mit PBS auf eine Konzentration von  $1 \times 10^9$  *L. major*/ml eingestellt. Diese Suspension wurde dann 10-mal abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Lösliches Leishmanienantigen wurde bei -80°C gelagert.

#### **2.2.1.4 Blutentnahme und Herstellung von Seren**

Für die Bestimmung *L. major*-spezifischer Immunglobuline im Serum von Mäusen wurde den Tieren ca. 100 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Alternativ wurden die Mäuse mit Fluran betäubt und das Blut mit Hilfe einer Pasteurpipette aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Nach vollständiger Gerinnung des Blutes wurde das Serum durch zweimalige Zentrifugation bei 10.000 g und Raumtemperatur für 10 Min. gewonnen und bei -20°C gelagert.

#### **2.2.1.5 Herstellung einer polyklonalen anti-SLA-IgG-Fraktion**

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen *L. major* Parasiten wurden einem weiblichen Kaninchen SLA (1:2 in kompletten Freund's Adjuvans (KFA) zu einer Wasser-Öl-Emulsion vermischt) sowohl subkutan als auch intramuskulär gespritzt. 4 und 8 Wochen nach der ersten Immunisierung wurde die entsprechende Lösung SLA in inkompletten

Freund's Adjuvans gespritzt. Zur Serumgewinnung ließ man das Blut über Nacht bei 4°C agglutinieren. Anschließend wurden die Zellbestandteile bei 4000rpm 10 Min. und 4°C abzentrifugiert. Aus dem resultierenden Antiserum wurde weiterhin mit dem Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit nach Angaben des Herstellers die IgG-Fraktion aus dem Serum gewonnen. Als Kontrolle für spätere Arbeiten mit der polyklonalen IgG-Fraktion wurde aus dem Kaninchen vor der Immunisierung Serum gewonnen und ebenfalls die IgG-Fraktion aufgereinigt.

#### **2.2.1.6 Zellzählung**

Die Zellzahl einer Suspension lässt sich mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmen. Dazu wurden die Zellen mit dem sauren Farbstoff Trypanblau vermischt. Dieser Farbstoff dringt in die Zelle ein und färbt diese tiefblau. Lebende Zellen können diesen Farbstoff wieder aus ihrem Zytosol transportieren, während tote Zellen blaugefärbt bleiben und somit im Mikroskop erkannt werden können. Die Verdünnung wurde in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 100 µm, Kammerfaktor  $1 \times 10^4$ ) ausgezählt. Aus dem Produkt der durchschnittlichen Anzahl der Zellen aus den vier Großquadraten mit dem Kammerfaktor  $1 \times 10^4$ , der Verdünnung und dem Volumen der Zellsuspension ergab sich die Gesamtzahl aller lebenden Zellen in der Suspension.

$$\begin{aligned} & \text{Mittelwert aus 4 Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \\ & \times \text{Kammerfaktor} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml Suspension}} \end{aligned}$$

#### **2.2.1.7 Isolierung von Zellen aus Knochenmark, Milz und Lymphknoten**

Milzen und popliteale Lymphknoten wurden unter sterilen Bedingungen entnommen. Daraufhin wurden die Organe auf ein Zellsieb (70µm), das mit RPMI-Medium getränkt ist, in eine 6-Well Zellkulturplatte überführt. Nachdem die Organe mit einem Stempel einer 2ml Spritze durch das Sieb gerieben worden sind, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 300g, 4°C für 10 Min. Lymphknotenzellen konnten direkt nach Bestimmung der Zellzahl in Experimenten eingesetzt werden. Milzzellen hingegen wurden nach Verwerfen des Überstands in 5ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert, nochmals zentrifugiert und sofort wie oben beschrieben mit RPMI-Medium gewaschen.

Knochenmarkzellen wurden wie folgt isoliert: Nach Entnahme von Tibia und Femur wurde unter sterilen Bedingungen das Knochenmark mit ~10ml RPMI-Kulturmedium herausgespült. Nach mehrmaligem resuspendieren wurde die Einzelzellsuspension bei 300g 5 Min. bei 4°C zentrifugiert.

#### **2.2.1.8 Isolierung von Zellen aus dem Fußgewebe**

Zur Isolierung von Zellen aus Mauspfoten wurden diese am Fersengelenk abgetrennt und mit einer Schere grob zerkleinert. Auf einem Metallsieb wurden mit Hilfe des Stempels einer 2 ml Spritze die zerkleinerten Gewebestücke in HBSS-Puffer (mit Calcium- und Magnesium-Zusatz) gerieben. Das Sieb wurde mit 10 ml HBSS gespült und die Suspension bei 300g 5 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit den zerkleinerten Fußgewebestücken in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml HBSS und 100 µl Kollagenase D (10mg/ml) 30 Min. bei 37° C auf einem Thermoschüttler verdaut. Die Zugabe von 10 µl 0,5M EDTA-Lösung führte zur Inaktivierung der Kollagenase D. Das verdaute Gewebe wurde wie oben beschrieben durch ein Zellsieb (70 µm) gedrückt und anschließend mit 10 ml RPMI-Vollmedium durchgespült. Nach der Zentrifugation bei 300 g und 4° C für 10 min wurden die Zellen direkt für die FACS-Analysen verwendet.

#### **2.2.1.9 Herstellung von GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand**

Zur Gewinnung von Zellkulturüberständen, welche rekombinantes GM-CSF zur Generierung von Knochenmark-DCs (vgl. 2.2.1.10) enthalten, wurden X6310 (X63Ag8-653) Zellen zweimal wöchentlich passagiert. Medium von zwei bis drei Tage alten Kulturen wurde gesammelt und 10 Min. bei 3220 g und 4° C zentrifugiert. Nach Sterilfiltrierung wurde der Überstand bei -20°C gelagert. Die Konzentration lag bei etwa 250 ng / ml.

#### **2.2.1.10 Generierung von Knochenmark-dendritischen Zellen (BMDC) und *in vitro* myeloiden Suppressorzellen (MDSCs)**

Hierfür wurde das Protokoll von Prof. Manfred Lutz (Lutz et al. 1999) verwendet. Zunächst wurden Tibia und Femur der Hinterbeine entfernt und in 70%-igem Isopropanol 2 Min. desinfiziert. Danach wurde unter sterilen Bedingungen das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle (19 mm x 0,4 mm) mit ~10 ml GM-CSF-haltigem RPMI-Kulturmedium gespült. Nach mehrmaligem resuspendieren wurde die Einzelzellsuspension bei 300g 5 Min. bei 4°C

zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1ml RPMI-Medium (mit GM-CSF) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Es wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 ml RPMI-Medium (mit GM-CSF) in einer Petrischale (Durchmesser 10 cm) ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 3 Tagen wurden 10 ml frisches GM-CSF-haltiges Medium hinzugefügt. An Tag 6 und 8 wurden 10ml vom Überstand entnommen, 5 Min. bei 300g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 10 ml resuspendiert. Die Suspensionszellen in frischem Medium wurden wieder vorsichtig in die Petrischale überführt. An Tag 10 konnten die Knochenmarkzellen als BMDCs in Experimenten verwendet werden.

An Tag 4 dieses Protokolls konnten Zellen gewonnen werden, die einen unreifen Phänotyp mit suppressiven Eigenschaften besitzen (Rößner et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Zellen als *in vitro* MDSCs bezeichnet.

#### **2.2.1.11 Durchflusszytometrie (FACS)**

Die Methode der Durchflusszytometrie wird verwendet, um Einzelzellsuspensionen zu untersuchen. Hierfür werden Zellen separat in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeführt, womit eine Charakterisierung der Zelle im Hinblick auf ihre Größe und Granularität möglich ist. Durch das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Foward scatter*) kann eine Aussage über die Größe der Zellen gemacht werden, durch das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side scatter*) über die Granularität. Die Durchflusszytometrie lässt auch komplexere Analysen mittels fluoreszenzkonjugierter Antikörper zu. Hiermit können sowohl Oberflächen- als auch intrazelluläre Proteine gefärbt werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe können im Durchflusszytometer entweder von einem Argon-Ionen-Laser (Anregungswellenlänge 488nm), einem Helium-Neon-Laser (Anregungswellenlänge 633nm), einem violetten Laser (Anregungswellenlänge 405nm) und einem UV-Laser (Anregungswellenlänge 355nm) angeregt werden. Zur Datenanalyse wurden sowohl Einparameter-Darstellungen (Histogramm) als auch Zweiparameter-Darstellungen (Dotplots) verwendet.

##### Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen

Um eine Einzelzellsuspension zu färben, wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Um die genaue Zellzahl zu bestimmen, wurden 10.000 Latex-Kugeln pro FACS-Röhrchen hinzugefügt, damit Zellverluste, die durch die Waschschrte entstehen, mit einkalkuliert werden können. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 300 g für 5 Min., wurde zur Blockierung von möglichen Fc-Rezeptoren auf den Zellen 1mg/ml Cohn-II zu den Zellen

hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 20 Min. bei 4°C. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer (2% FCS in PBS) für 5 Min. bei 300 g, wurden die entsprechenden Antikörperversdünnungen (s. 2.1.4) hinzugegeben und für 20 Min. bei 4°C inkubiert. Falls ein biotinylierter Antikörper eingesetzt wurde, erfolgte nach einem weiteren Waschschrift eine Inkubation mit einem Streptavidin-Konjugat für 20 Min. bei 4°C. Wenn die gefärbten Zellen zum letzten Mal gewaschen wurden, konnten diese entweder sofort in 200 µl FACS-Puffer im Durchflusszytometer analysiert werden oder nach einer Fixierung mit 4% PFA/FACS-Puffer zu einem späteren Zeitpunkt gemessen werden. Die Messung wurde an einem BD LSRII mit der Software FACSDiva durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm *FlowJo* herangezogen. Die prozentualen Werte einer Zellpopulation konnten direkt aus *FlowJo* verwendet werden. Zur Berechnung der absoluten Zellzahl einer Zellpopulation im gesamten Organ wurden zunächst die Anzahl der verbliebenen Zellen im FACS-Röhrchen durch die Anzahl der verbliebenen Latex-Kugeln im FACS-Röhrchen dividiert. Um die Anzahl der Zellpopulation im FACS-Röhrchen zu erhalten wurde dieser Quotient mit der Anzahl der eingesetzten Latex-Kugeln multipliziert. Da pro FACS-Röhrchen  $0,5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt wurden und die Zellzahl der Einzelzellsuspension des Organs bestimmt wurde, konnte mit der Multiplikation dieses Verdünnungsfaktors mit der berechneten Anzahl der Zellen pro FACS-Röhrchen die absolute Zellzahl pro Organ ermittelt werden.

$$\frac{\text{Zellzahl pro Röhrchen}}{\text{Anzahl verbliebener Latex Kugeln}} \times \text{Anzahl eingesetzter Latex Kugeln} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### Intrazelluläre Färbung für die Durchflusszytometrie

Für einen intrazellulären Nachweis von Proteinen wurden zunächst die Oberflächenproteine der Zellen wie oben beschrieben gefärbt. Daraufhin wurden die Zellen zur Permeabilisierung mit 100 µl BD Cytofix/CytoPerm-Lösung bei RT für 30 Min. inkubiert und anschließend mit 1 ml BD PermWash gewaschen. Nun konnten die entsprechenden Antikörperversdünnungen für 20 Min. bei 4°C hinzugegeben werden. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen analysiert.

Für einen intrazellulären Nachweis des Enzyms Arginase-1, wurde der unkonjugierte Arginase-1 Antikörper (1:1000) mit einem Goat-anti-Mouse-IgG-AF488 (1:500) Sekundär-Antikörper für 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde 5% Mausserum in diesen Ansatz pipettiert und für 30 Min. auf Eis inkubiert, um zu verhindern, dass der restliche Sekundärantikörper unspezifisch bindet. Diese Lösung wurde in der intrazellulären FACS-Färbung verwendet.

### Analyse der Zellproliferation *in vivo* (anti-BrdU-Färbung)

Um die *in vivo*-Proliferation von Zellen nachweisen zu können, wurde ein BrdU-Test durchgeführt (s. 2.2.2.3). Dabei bauen proliferierende Zellen das Thymidin-Analogon BrdU in ihre DNA ein. Dieser Einbau kann durch Färbung mit einem Antikörper gegen BrdU durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Zunächst erfolgte die Färbung extrazellulärer Proteine nach dem oben beschriebenen Protokoll. Danach wird die Plasmamembran mit 100 µl Cytofix / Cytoperm für 30 Min. bei RT permeabilisiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml BD Perm / Wash wurden die Zellen in 100 µl PBS / 1 % BSA / 0,01 % Triton-X100 für 10 Min. bei 4° C inkubiert, wodurch die Kernmembran permeabilisiert wurde. Dann wurden die Zellen erneut für 5 Min. bei Raumtemperatur mit 100 µl Cytofix / Cytoperm inkubiert, mit 1 ml Perm / Wash-Lösung gewaschen und für 60 Min. bei 37° C mit 30 µg DNase / 100 µl PBS inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Perm / Wash-Lösung wurden 2,5 µl des FITC-konjugierten anti-BrdU Antikörpers direkt in den Rücklauf zum Zellpellet gegeben. Nach dem Mischen folgte ein Inkubationsschritt für 20 Min. bei RT. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in PBS / 2 % FCS / 4 % PFA resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

### **2.2.1.12 Zellseparation mittels Durchflusszytometrie (FACSaria)**

Zellen können mit verschiedenen Methoden in Populationen aufgetrennt werden: zum einen durch Durchflusszytometrie mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern oder durch magnetische Zellseparation (siehe 2.2.1.13). In dieser Arbeit wurden *in vitro* generierte MDSCs an Tag 4 (siehe 2.2.1.10) sortiert. Zunächst wurden auf diesen Zellen wie in 2.2.1.11 beschrieben die Oberflächenproteine CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Hierbei ist zu beachten, dass die Zellzahl höher ist als  $0,5 \times 10^6$  und deshalb die Antikörperverdünnungen niedriger angesetzt werden müssen (in der Regel die doppelte Menge an Antikörper). Zum Ende wird die Zellkonzentration auf  $2 \times 10^7$  / ml eingestellt und sortiert. Die *in vitro* Zellpopulation wurde in CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>high</sup> Ly6G<sup>-</sup> Mo-MDSCs und CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>int</sup> Ly6G<sup>+</sup> PMN-MDSCs aufgetrennt. Das Sammelröhrchen enthielt 20% FCS / PBS und nach einem abschließenden Waschschrift mit entweder PBS (zur Analyse der RNA) oder mit RPMI-Medium (zur Analyse in Zellkulturexperimenten) konnten die Zellen verwendet werden.

### **2.2.1.13 Magnetische Zellseparation (MACS = *magnetic activated cell sorting*)**

Eine weitere Möglichkeit Zellpopulationen aufzutrennen ist die magnetische Zellseparation mit MACS. In der vorliegenden Arbeit wurden T-Zellen aus poplitealen Lymphknoten infizierter Mäuse auf diese Weise isoliert. Die poplitealen Lymphknoten wurden unter sterilen Bedingungen entfernt, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die Zellauftrennung erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels Anti-PE MicroBeads. Die Zellen wurden für 15 Min. mit anti-CD11b-PE (myeloide Zellen), anti-B220-PE (B-Zellen) und anti-CD11c-PE (dendritische Zellen) Antikörpern in MACS-Puffer (0,5% BSA, 2mM EDTA in PBS pH 7,2) markiert (Verdünnung für alle Antikörper 1:200). Anschließend wurden mittels anti-PE Beads über MACS-Depletionssäulen (LD Säulen) die mit PE markierten Zellen depletiert. Die nicht markierte Zellfraktion (CD11b<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup>) wurde als T-Zellfraktion verwendet.

#### **2.2.1.14 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Mit Hilfe eines ELISA können in einer Lösung enthaltene Proteine spezifisch nachgewiesen und quantifiziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit diente diese Methode zum Nachweis *L. major*-spezifischer Immunglobuline in den Seren infizierter Mäuse. Um diese nachweisen zu können wurden promastigote *L. major* Parasiten geerntet (s. 2.2.1.2) und anschließend auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Parasiten / ml eingestellt. 50 µl dieser Suspension wurden pro Vertiefung auf eine Nunc ELISA-Platte pipettiert. Die Platte wurde für 8 Minuten bei 2800 rpm ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Parasiten für 5 Min. bei RT mit 50µl 0,25% Glutaraldehyd fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungen durch eine Inkubation mit 200 µl PBS/1 % BSA über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer blockiert. Durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBS/0,05% Tween20 wurde der Blockpuffer entfernt. Pro Vertiefung wurden 50 µl Probelösung (1:100 in PBS verdünntes Serum) als Duplikate aufgetragen und wiederum über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte erneut 3-mal gewaschen, bevor 50 µl Isotyp spezifischer Ratte-anti-Maus Antikörper (HRP-konjugiert, s. 2.1.4) in Blockpuffer gelöst, hinzugefügt wurde. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C und dreimaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween20 wurden 100 µl der BD OptEIA Substratlösung (1:1 Lösung A und Lösung B) in jeden Ansatz pipettiert. Sobald in der Kontrolle eine Blaufärbung erkennbar war, wurde die Reaktion mit 50 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Ansatz abgestoppt. Die so entstandene Gelbfärbung wurde bei 450 nm am ELISA-Reader vermessen. Die ermittelten Werte wurden durch den Wert eines naiven Serums dividiert, um relative ELISA-Einheiten (REUs) zu berechnen.

### **2.2.1.15 Immunfluoreszenzfärbung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl naïve als auch mit *L. major* infizierte Organe, wie popliteale Lymphknoten, Milzen und Fußgewebe, immunhistologisch untersucht. Dabei werden dünne Gewebeschnitte hergestellt, auf denen gezielt zelluläre Strukturen oder Proteine angefärbt werden können. Hierfür wurden Organe zur Kryokonservierung in Killik Einbettmedium in der Gasphase flüssigen Stickstoffs tiefgefroren. Bis zum Anfertigen der Gewebsschnitte wurden die Organe bei -80 °C gelagert. Um das Anhaften der Schnitte auf dem Objektträger zu gewährleisten, wurden poly-L-Lysin beschichtete Objektträger benutzt. Es wurden 8 µm dicke Schnitte mit einem Einmalmesser angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei RT getrocknet.

Am nächsten Tag folgte die Fixierung der Schnitte in -20 °C kaltem Aceton. Daran anschließend wurden die Objektträger insgesamt 12 Minuten getrocknet, um den Fettstift auftragen zu können. Nach 5 Min. Trocknungszeit verhindert die Umrandung der Schnitte mit dem Fettstift die Verteilung der Färbelösung auf dem Objektträger. Um das Einbettmedium zu entfernen wurden die Schnitte dreimal 5 Min. in PBS / 0,05% Tween20 gewaschen. Anschließend folgte die Blockierung der Fc-Rezeptoren mit PBS/10% Mausserum/10% FCS für 30 Min. bei RT. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschrift wurden die entsprechenden Antikörpervedünnungen hinzupipettiert (in PBS / 10% FCS). Die Inkubation erfolgte bei RT in einer feuchten Kammer für 1 Stunde. Falls ein Biotin-konjugierter Antikörper verwendet wurde mussten die Schnitte nach einem dreimaligen Waschschrift mit einem entsprechenden Streptavidin-Konjugat (in PBS / 10% FCS) für 45 Min. bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert werden. Für das Anfärben des Zellkerns wurde der Farbstoff DAPI (1:1000 in PBS) verwendet, der sich an AT-reiche DNA-Bereiche anlagert. Der Farbstoff wurde für 10 Min. bei RT in einer feuchten Kammer hinzugefügt. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Schnitte mit PermaFluor Medium eingedeckelt und über Nacht bei RT im Dunkeln getrocknet.

Für eine Färbung der intrazellulären Proteine, wurde nach dem Blockierungsschritt eine 30-minütige Inkubation von 0,01% Saponin-Lösung (in PBS / 10% FCS) bei RT hinzugefügt. Die weiteren Schritte entsprechen dem oben beschriebenen Protokoll.

### **2.2.1.16 CFSE-Markierung von *L. major* oder T Zellen**



Von MACS-sortierten T-Zellen aus poplitealen Lymphnoten von infizierten C57BL/6- oder BALB/c-Mäusen (siehe 2.2.1.13) wurden  $1 \times 10^7$  Zellen bei 300 g, 4°C und 5 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer CFSE-Lösung (Endkonzentration: 1µM in PBS) und für 10 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass die Inkubation im Dunkeln erfolgt. Anschließend wurden die CFSE-markierten Zellen mit 5% FCS / PBS (RT) zweimal gewaschen (300g, 5 Min., 4°C). Mittels FACS-Analyse wurde kontrolliert, ob die CFSE-Färbung erfolgreich war (positives FITC-Signal). Auf dieselbe Weise können aufgereinigte Leishmanien (siehe 2.2.1.2) gefärbt werden.

#### **2.2.1.17 Generierung von peritoneal Exudat Makrophagen (peritoneal exudate cells = PECs)**

Zur Gewinnung von peritonealen Makrophagen wurde Mäusen 1 ml einer 3%-igen Thioglykolat-Lösung (in Millipore H<sub>2</sub>O) i. p. mit einer 0,4 x 19 mm Kanüle verabreicht. 3 Tage später wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und das Peritoneum mit 10 ml RPMI-Vollmedium gespült. Die erhaltenen PECs wurden in eine 50 ml Sarstedt-Röhre überführt und zweimal mit RPMI-Vollmedium gewaschen (300 g, 5 Min. 4°C). Nach Ermittlung der Zellzahl wurden  $2 \times 10^5$  PECs in 200 µl RPMI-Vollmedium in 96-Well Platten ausgesät. Zellen die nach 18 h nicht adhärirt waren wurden gewegewaschen und die PECs konnten in Experimenten eingesetzt werden. Für eine Infektion der Zellen mit *L. major* wurden  $1 \times 10^6$  Parasiten pro Well hinzugefügt und nach 24 h gewegewaschen. Nach weiteren 2 Tagen Inkubation (mit oder ohne Stimulation) wurden die Zellen mit 4%-PFA Lösung im Well für 10 Min. fixiert. Daraufhin wurden die Wells einmal mit PBS / 2% FCS gewaschen und die Zellen mit unspezifischem Mausserum (10% in PBS / 10% FCS) für 30 Min. bei RT geblockt. Nach einem weiteren Waschschrirt wurde mit einem rabbit-anti-SLA-IgG (1:100; siehe 2.2.1.5) in 0,01% Saponin-Lösung in PBS für 1 Stunde bei RT gefärbt. Die Zellen wurden mit einem goat-anti-rabbit-AF546 Antikörper nach einem weiteren Waschschrirt für 45 Min. bei RT inkubiert. Eine abschließende DAPI-Färbung wurde angefertigt, um die Zellkerne zu markieren.

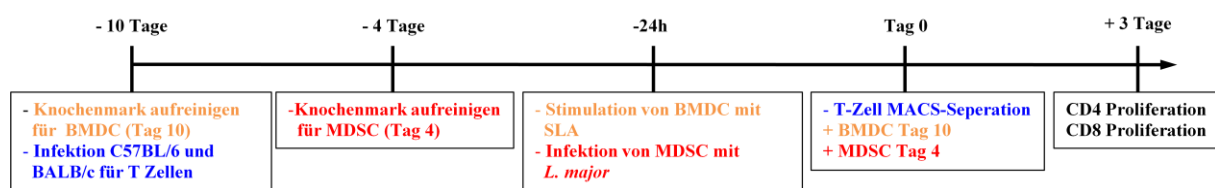
#### **2.2.1.18 Leishmanienantigen-spezifischer T-Zell Suppressionsassay**

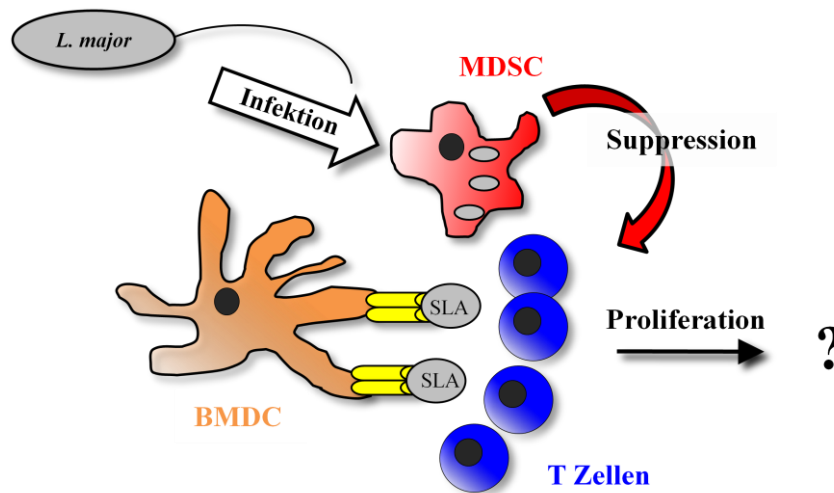
Um Leishmanien spezifische T-Zellen zu gewinnen, wurden C57BL/6- oder BALB/c-Mäuse in beide Hinterpfoten mit  $3 \times 10^6$  *L. major* infiziert. 10 Tage später wurden die poplitealen Lymphknoten entfernt, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die T-Zellen wurden wie

in 2.2.1.13 beschrieben mittels MACS-Separation aufgearbeitet. Anschließend wurden die Zellen mit CFSE-markiert (siehe 2.2.1.17). Als antigenpräsentierende Zellen wurden BMDCs (siehe 2.2.1.10) nach dem Protokoll von (Lutz et al. 1999) generiert. An Tag 9 der Zellkultur wurden die Zellen geerntet und mit SLA (Konz. =  $10^9$ /ml; siehe 2.2.1.3) in einem Verhältnis von 1:1 über Nacht in 96-Well Platten inkubiert, um als leishmanienspezifische antigenpräsentierende Zellen zu agieren. Als MDSCs wurden, wie in 2.2.1.10 beschrieben, BMDCs an Tag 4 nach Isolation aus dem Knochenmark verwendet. An Tag 3 wurden diese *in vitro* generierten MDSCs mit Leishmanienparasiten über Nacht im Verhältnis 1:5 kokultiviert. Für den Suppressionsassay wurden  $2 \times 10^5$  T-Zellen mit BMDCs (Tag 10) und MDSCs (Tag 4) im Verhältnis 10:1:10 in 96-Well-Rundbodenplatten in 200  $\mu$ l RPMI-Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 3 Tage kokultiviert. An Tag 3 der Kokultur wurde eine FACS-Färbung (siehe 2.2.1.11) gegen CD4 und CD8 T-Zellen durchgeführt. Proliferierende T-Zellen wurden nach folgender Berechnung ermittelt:

$$\frac{\% \text{ Anteil CFSElow CD4 T Zellen}}{\% \text{ Anteil aller CD4 – Zellen}}$$

In Abb. 2.3 ist der schematische Aufbau des T-Zell Suppressionsassays zusammenfassend dargestellt.





**Abb. 2.3: Schematischer Aufbau des Leishmanienantigenspezifischen T-Zell Suppressionsassays.** 10 Tage vor dem Assay wurden C57BL/6- oder BALB/c-Mäuse mit *L. major* infiziert. Am selben Tag wurden BMDCs (orange) angesetzt. 4 Tage vor dem Assay wurden MDSCs (rot) angesetzt. BMDCs wurden mit SLA (grau) und MDSCs mit *L. major* (grau) inkubiert und 24 Stunden später zusammen mit den mittels MACS isolierten T-Zellen für 3 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kokultiviert.

#### 2.2.1.19 Nitritnachweis in Zellkultur-Überständen (Grieff-Reaktion)

Für den Nachweis von Nitrit in Zellkultur-Überständen wurde der Grieff-Test verwendet. Dazu wurden Grieff-Reagenz A und Grieff-Reagenz B zu gleichen Teilen vermischt. 100 µl des Zellkulturüberstandes wurden in 96-Well-Platten überführt. Als Standard wurde NaNO<sub>2</sub> verwendet, welches von einer 100 µM Konzentration über 7 Log<sub>2</sub> Stufen verdünnt wurde. Als Nullwert wurde RPMI-Vollmedium verwendet. Zu allen Ansätzen werden 100 µl des Grieff A+B Gemisches hinzupipettiert und bei einer Wellenlänge von 540nm an einem ELISA-Reader in Duplikaten gemessen.

#### 2.2.2 Tierversuche

Für die Tierversuche wurden weibliche Mäuse ab einem Alter von 8 Wochen verwendet. Dabei wurden die Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes eingehalten.

##### 2.2.2.1 Infektion mit *L. major*, Fußdickenmessung und DTH-Reaktion

Promastigote Leishmanien in der stationären Wachstumsphase wurden wie in 2.2.1.2 beschrieben aufgereinigt und gezählt. Im hier verwendeten *high-dose* Modell wurden  $3 \times 10^6$  *L. major* in 30 µl PBS in die rechte Hinterpfote von C57BL/6-, BALB/c- oder CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen subkutan injiziert. Hierfür wurden die Mäuse am Abdomen in einer Glasröhre fixiert. Der Verlauf der Leishmaniose wurde wöchentlich anhand der Zunahme der Schwellung des

Fußes dokumentiert. Dazu wurde der Durchmesser des infizierten Fußes mit Hilfe eines Fußdicken-Messgeräts gemessen. Anschließend wurde die prozentuale Zunahme des Durchmessers der infizierten rechten Pfote gegenüber der linken uninfizierten Pfote berechnet.

Zudem kann zur Untersuchung der Immunantwort der Gedächtnis-T-Zellen eine DTH (*delayed type hypersensitivity reaction*) - Reaktion durchgeführt werden. Dazu erhielten Tiere, deren Primärinfektion komplett abgeheilt war, eine Injektion von 30 µl SLA (Konzentration entsprach  $3 \times 10^6$  Parasiten) in die kontralaterale Pfote. Die Pfortenschwellung wurde täglich gemessen und als prozentualer Anstieg gegenüber einer 2 mm dicken Pfote, was der durchschnittlichen Dicke einer naiven Pfote entspricht, dargestellt.

#### **2.2.2.2 Gemcitabin Behandlung von Mäusen**

Das Zytostatikum Gemcitabin findet hauptsächlich in der Krebstherapie Verwendung. Das Cytidin-Analogon wird von einer Zelle aufgenommen und daraufhin in das Genom eingebaut, was zum Absterben der Zelle führt. Ein ungewollter Nebeneffekt des Chemotherapeutikums ist eine Schädigung des hämatopoetischen Systems im Knochenmark. Dieser Nebeneffekt wurde in dieser Arbeit ausgenutzt, um die Anzahl myeloider Vorläuferzellen des Knochenmarks zu reduzieren (Le et al. 2009). Hierfür wurden Mäuse intraperitoneal (i.p.) mit Gemcitabin (in PBS) in einer Dosis von 1,2 mg / Maus behandelt. 24h später wurden die Mäuse s.c. in die Hinterpfote mit *L. major* infiziert (siehe 2.2.2.1). Die Gemcitabin-Gabe erfolgte alle 5 Tage für die folgenden 20 Tage der Infektion. Die Fußdicke wurde dabei wöchentlich ermittelt. Als Kontrollgruppe wurden Mäuse mit der gleichen Menge an PBS i.p. behandelt.

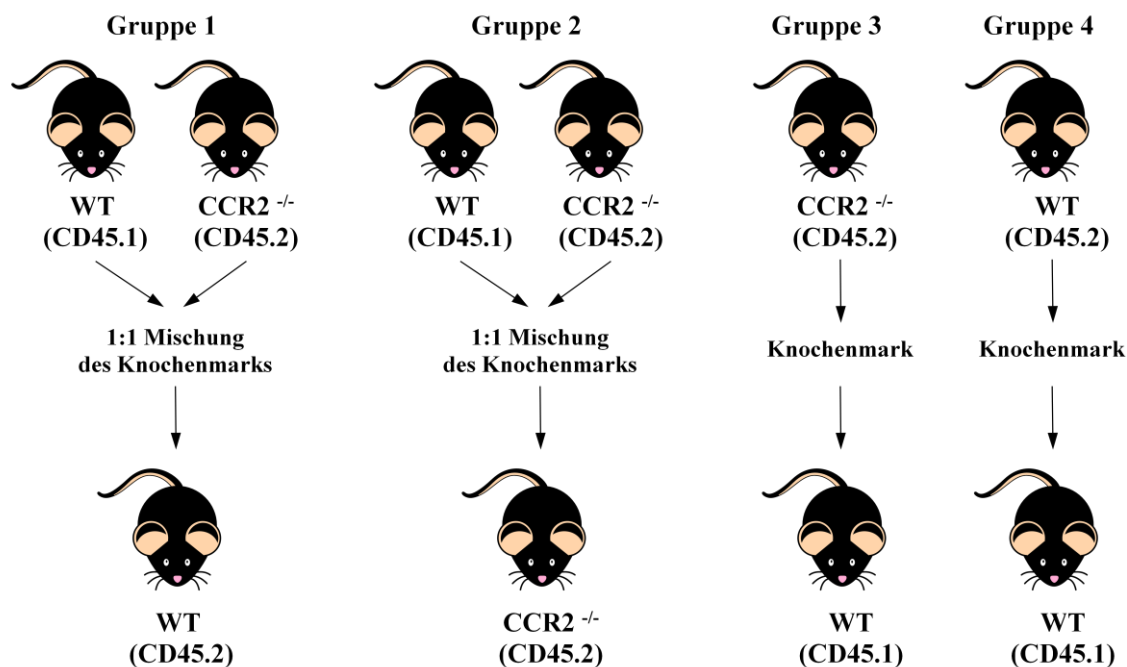
#### **2.2.2.3 Nachweis der Zellproliferation *in vivo* mittels BrdU**

Für die Analyse von proliferierenden Zellen *in vivo* wurde Mäusen 3 Tage vor dem Analysezeitpunkt das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) in einer Konzentration von 0,8 mg / ml im Trinkwasser verabreicht. Wie in 2.2.1.11 beschrieben können Zellen, die BrdU in ihre DNA eingebaut haben, durch eine intrazelluläre FACS-Färbung detektiert werden.

#### **2.2.2.4 Generierung von Knochenmark-Chimären Mäusen (CCR2<sup>-/-</sup> ↔ WT)**

Die Generierung chimärer Mäuse, in der nur die hämatopoetischen Zellen ohne einen funktionsfähigen C-C Chemokinrezeptor 2 (CCR2) ausgestattet sind, erlaubt es, Aussagen über die Rolle von CCR2 ausschließlich über hämatopoetische Zellen zu treffen. Außerdem kann getestet werden, ob eine 50%-ige oder 100%ige Rekonstitution eines CCR2-defizienten Knochenmarks mit Wildtyp-Knochenmark ausreicht, um einen bestehenden Phänotyp aufzuheben.

Um einen erfolgreichen Knochenmark-Transfer durchzuführen, wurden die verwendeten Mäuse zunächst bei 6 Gray in einem Strahlengerät bestrahlt. Nach 5 Stunden wurden die Mäuse erneut bei 6 Gray bestrahlt. 4 Stunden nach der zweiten Bestrahlung, wurde den Mäusen  $2,5 \times 10^6$  Knochenmarkzellen i.v. über die Schwanzvene verabreicht. Folgende Ansätze wurden hierfür generiert:



**Abb. 2.4: Schema zur Generierung von Mäusen mit chimärem Knochenmark.**

Wie in Abbildung 2.4 dargestellt, erlaubt es Gruppe 1 WT und CCR2-defiziente hämatopoetische Zellen im selben Tier zu untersuchen. In Gruppe 2 ist diese Untersuchung im CCR2<sup>-/-</sup> Tier möglich. Gruppe 3 dient als Kontrolle für den knock-out Phänotyp und Gruppe 4 für den WT Phänotyp.

4 Wochen nach dem Knochenmark-Transfer wurde den Mäusen aus der Schwanzvene Blut entnommen und wie in 2.2.1.11 für eine durchflusszytometrische Untersuchung gefärbt. Chimäre Mäuse zeigten zu etwa 50% die Expression von CD45.1 und CD45.2 (Gruppe 1 und 2). Gruppe 3 und 4 zeigten zu etwa 95% die Expression von CD45.2 auf hämatopoetischen Zellen. 6 Wochen nach dem Knochenmark-Transfer wurden die chimären Mäuse mit *L. major* s.c. in die Hinterpfote infiziert (siehe 2.2.2.1). Die Fußdickenschwellung wurde wöchentlich dokumentiert.

### 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus Organen

Um genomische DNA aus Mausorganen oder Gewebestücken zu isolieren wurden kleine Stücke der für die Analyse notwendigen Organe in einem 2 ml Reaktionsgefäß in 500 µl Zelllyse-Puffer aufgenommen. Füße wurden komplett zur Isolation der genomischen DNA herangezogen und daher in 1000 µl Zelllyse-Puffer lysiert. Um störende Proteine zu entfernen erfolgte der Verdau zusammen mit 10 µl Proteinase K bei 58°C und 1000 rpm über Nacht im Thermoschüttler. Nach Abkühlen auf RT wurden die restlichen Proteine durch Zugabe von 200 µl Proteinpräzipitations-Puffer und anschließendem starkem vortexen für 20 Sekunden gefällt. Zur Abtrennung dieser Proteine wurden die Proben 10 Min. bei 1700g zentrifugiert. Der proteinfreie Überstand wurde zur Fällung der DNA zu 700 µl 100%-igem Isopropanol gegeben, 50-mal invertiert und bei 20800 g und RT für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 70 %-iger unvergällter Ethanol zum Pellet gegeben. Nach erneutem Zentrifugieren bei 20800 g und RT für 5 Min. wurde der Überstand erneut verworfen und das DNA-Pellet für 45 Min. an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die DNA der Organe in 50 µl DNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst und bei 4° C gelagert. Die DNA, die aus den Mauspfoten isoliert wurde, musste hingegen in bis zu 1 ml DNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst werden.

#### 2.2.3.2 RNA Isolierung aus *in vitro* Zellkulturen

Um festzustellen, ob Zellen ein bestimmtes Gen vermehrt exprimieren, wurde die Analyse der mRNA Expression herangezogen. Hierzu musste erst die RNA aus *in vitro* Kulturen oder Einzelzellsuspensionen von Organen isoliert werden. Dafür wurde das NucleoSpin® RNA II Kit verwendet. Zunächst wurden bis zu  $5 \times 10^6$  Zellen in 350 µl Lysepuffer, der mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt war, lysiert. Damit die Nukleinsäuren extrahiert werden können, wurden die lysierten Zellen auf eine Säule gegeben und bei 11000 g für 1 Min. zentrifugiert. Um die Nukleinsäuren zu fällen wurde 350 µl 70%-iger Ethanol zum Lysat hinzugefügt. Für die Isolierung der Nukleinsäuren wurde das Lysat auf eine andere Säule pipettiert, damit die Nukleinsäuren binden können. Nach einem Waschschrift mit 350 µl Entsalzungspuffer wurde die Säule mit 100 µl rekombinanter DNase für 15 Min. bei RT inkubiert. Nach 2 Waschschriften mit einem ethanolhaltigem Waschpuffer konnte die RNA in 50µl Rnase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert werden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 2.2.3.3 Reverse Transkription von RNA

Um mRNA (siehe 2.2.3.2) in einer qRT-PCR verwenden zu können, muss aus der einsträngigen mRNA eine Doppelstrang-RNA synthetisiert werden. Hierzu wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit verwendet. Nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration konnte die Reaktion mit folgendem Ansatz angesetzt werden:

5x iScript reaction Mix	4µl
iScript reverse Transkriptase	1µl
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	x µl (= 15µl - Volumen RNA-Template)
RNA Template	500 ng (entsprechendes Volumen)
Volumen gesamt	20µl

Der Reaktions-Mix wurde anschließend in einem MyCycler™ mit folgendem Protokoll inkubiert:

Schritt 1: 5 Min. bei 25° C

Schritt 2: 30 Min. 42° C

Schritt 3: 5 Min. bei 85° C

Reaktion bei 4° C kühlen (optional)

Die resultierende cDNA kann nun in qRT-PCR Experimenten verwendet werden (siehe 2.2.3.4).

### 2.2.3.4 qRT-PCR zum Nachweis von iNOS, Arginase-1 und IDO mRNA

Bei der quantitativen Real Time-PCR (qRT-PCR) handelt es sich um eine Methode, bei der eine bestimmte Polynukleotidsequenz quantifiziert wird, indem die initiale Konzentration soweit amplifiziert wird, bis eine Detektion ermöglicht wird. Um die Zunahme des PCR-Produkts verfolgen zu können gibt es verschiedene Methoden. In dieser Arbeit wurde die Detektion mit SYBR Green I nachverfolgt. SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff und bindet doppelsträngige DNA. Ungebunden emittiert der Farbstoff nur in geringem Maße. Durch die Bindung an DNA wird das Fluoreszenzsignal stark erhöht. Dieser Einbau von SYBR-Green in die DNA ist messbar, da der entstehende DNA-Farbstoff-

Komplex blaues Licht (494 nm) absorbiert und grünes Licht (522 nm) emittiert. Ab einem bestimmten Punkt übersteigt das Fluoreszenz-Signal den Hintergrund. Der Amplifikations-Zyklus, in dem das der Fall ist, wird „*cycle threshold*“ (ct) (Schwellenwert-Zyklus) genannt. Da SYBR Green unspezifisch an doppelsträngige DNA-Fragmente bindet wurden Schmelzkurven-Analysen nach jedem Lauf durchgeführt. Nach 45 Amplifikationszyklen wurden die PCR-Produkte zuerst 1 Minute auf 55 °C abgekühlt. Für die Schmelzkurven-Analyse wurden die Proben in 0,5 °C-Schritten bis 95 °C aufgeheizt. Das Fluoreszenzsignal nimmt dabei langsam ab, bis die Schmelztemperatur des PCR-Produkts erreicht ist und ein starker Abfall der Fluoreszenz detektiert werden kann. Hier wurde darauf geachtet, dass nur einmal ein solcher Abfall der Fluoreszenz erfolgt, da sonst mehrere unspezifische Produkte entstanden sind. Die Vervielfältigung des gewünschten, durch die Primer-Sequenzen bestimmten, PCR-Produkts sollte exponentiell erfolgen.

Die cDNA (1 µg / 40 µl; siehe 2.2.3.3) wurde 1:5 mit Nuclease-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt. Für die PCR-Reaktion wurde folgende Zusammensetzung angesetzt:

sense-Primer	1 µl
Antisense-Primer	1 µl
iQ™ SYBR Green Supermix	12,5 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	5,5 µl
cDNA (1:5 verdünnt)	5 µl
Volumen total	25 µl

Die PCR-Reaktion wurde in einem Bio-Rad iQ5 real-time PCR-Cycler durchgeführt. Hierfür wurde folgendes Programm gewählt:

Schritt 1: 95°C für 4 Min.

Schritt 2: 95°C für 20 Sek.

Schritt 3: 59°C für 1 Min.

Schritt 4: 95°C für 1Min.

Schritt 5: 55°C für 1 Min.

Schritt 6: Schmelzkurve in 0,5°C Schritten bis 95°C (= 81 Zyklen)

Von Schritt 2 und 3 wurden 45 Zyklen durchgeführt.



Um die relative Menge der cDNA pro Probe bestimmen zu können wurde die Expression des Zielgens auf ein zweites Gen bezogen, welches möglichst ubiquitär und homogen exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und  $\beta$ -Aktin als Referenzgene verwendet. Für jedes Gen erfolgte die Messung als Triplikat. Die Ergebnisse wurden nach der  $\Delta$ ct Methode ausgewertet:

$$\Delta ct = ct_{\text{Zielgen}} - ct_{\text{Referenzgen}}$$

$$\text{mRNA Expression des Zielgens relativ zum Referenzgen} = E^{-\Delta ct}$$

E steht für die Primer-Effizienz. Zur Auswertung der Daten wurde mit einer Effizienz von 2 gearbeitet.

### 2.2.3.5 qRT-PCR zur Bestimmung der Parasitenlast in Organen

Um den Verlauf einer Immunreaktion nach einer Infektion mit *L. major* verfolgen zu können, wurde unter anderem die Anzahl der Parasiten in den Füßen, Milzen, poplitealen sowie inguinalen Lymphknoten der infizierten Mäuse bestimmt. Dies geschah mit Hilfe von RT-PCR-Analysen. Dazu musste zunächst genomische DNA aus den infizierten Geweben gewonnen werden (siehe 2. 2.3.1). Nach photometrischer Bestimmung des DNA-Gehalts in den Proben wurde die Konzentration auf 125 pg /  $\mu$ l eingestellt. Die Standardkurve zur Bestimmung des  $\beta$ -Aktin-Gehalts der Proben wurde erstellt, indem genomische DNA einer Mäusemilz isoliert und auf eine Konzentration von 12500 pg /  $\mu$ l eingestellt wurde. Durch eine Verdünnungsreihe erhielt man Konzentrationen von 1250 pg /  $\mu$ l, 125 pg /  $\mu$ l, 12,5 pg /  $\mu$ l und 1,25 pg /  $\mu$ l, von denen jeweils 1  $\mu$ l pro Probe eingesetzt wurde. Zur Bestimmung des Gehalts an Leishmanien-DNA wurde das Plasmid von Christian Drostens verwendet (Schulz et al. 2003), welches mehrere Kopien der 18S-rRNA-Sequenz des Leishmaniengenoms enthält. Hierfür wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe erstellt, ausgehend von der  $10^{-2}$ -Verdünnung (wurde vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg zur Verfügung gestellt). Die Verdünnungen erfolgten in Maus-DNA ( $c = 125$  pg /  $\mu$ l). Die  $10^{-2}$  - Verdünnung entspricht  $10^8$  Units /  $\mu$ l. Die aus der Verdünnungsreihe resultierenden Konzentrationen  $10^{-5}$  ( $10^5$  Units /  $\mu$ l),  $10^{-6}$  ( $10^4$  Units /  $\mu$ l),  $10^{-7}$  ( $10^3$  Units /  $\mu$ l) und  $10^{-8}$  ( $10^2$  Units /  $\mu$ l) wurden zur Erstellung einer Standardkurve verwendet. Durch die RT-PCR wurde zum einen Maus- $\beta$ -Aktin nachgewiesen, zum anderen wurde die in den Proben enthaltene *Leishmanien*-18S-rRNA quantifiziert. Mit Hilfe der gemessenen Kopienzahlen konnte dann die Anzahl der sich im Gewebe befindlichen Parasiten berechnet werden.

Für jede Probe wurde folgender Ansatz in eine 96-Well Platte pro Well pipettiert:

- 12,5 µl iQ™ SYBR Green Supermix
- 2 µl Primer (entweder Maus-β-Aktin oder *Leishmania* spezifisch)
- 9,5 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl genomischer DNA-Probe

Anschließend wurde die PCR-Platte mit einer selbstklebenden Folie versiegelt und am BioRad iCycler iQ5 mit folgendem PCR-Programm die PCR gestartet:

Schritt 1: Initiale Denaturierung bei 95° C für 13 Minuten

Schritt 2: Denaturierung bei 95° C für 20 Sekunden

Schritt 3: *Annealing* bei 58° C für 30 Sekunden

Schritt 4: Elongation bei 72° C für 30 Sekunden

Schritt 5: 24° C für 5 Minuten

Die Schritte 2-4 wurden 40-mal wiederholt.

## 2.3 Statistik

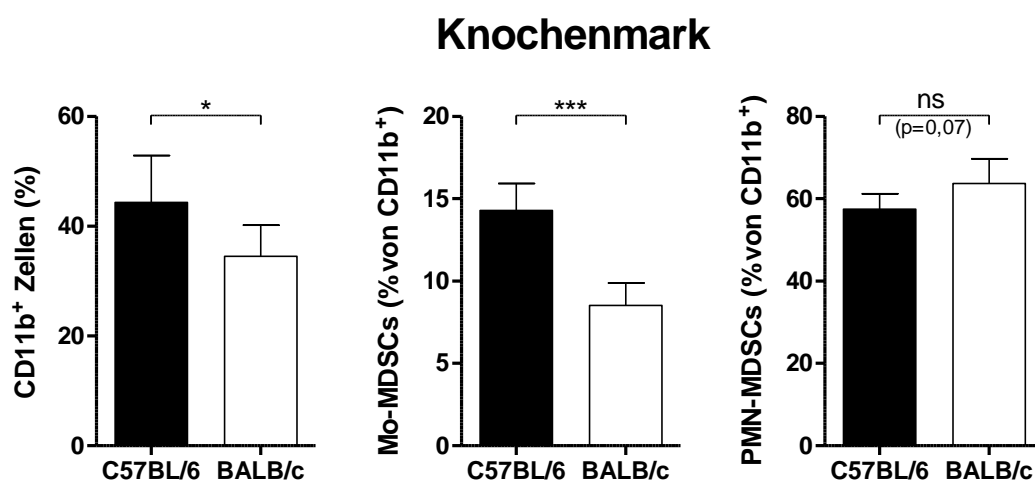
Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.03. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Für die Berechnung der Signifikanzen wurde der jeweils angegebene Test verwendet (student's t-test oder 2wayANOVA). Ein p-Wert von <0,05 (\* = p<0,05; \*\* = p<0,005; \*\*\* = p<0,0005; ns = nicht signifikant) wurde als statistisch signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung von MDSCs in naiven C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

##### 3.1.1 Durchflusszytometrische Analyse von Knochenmark, Blut, Milz, poplitealen Lymphknoten und Fussgewebe

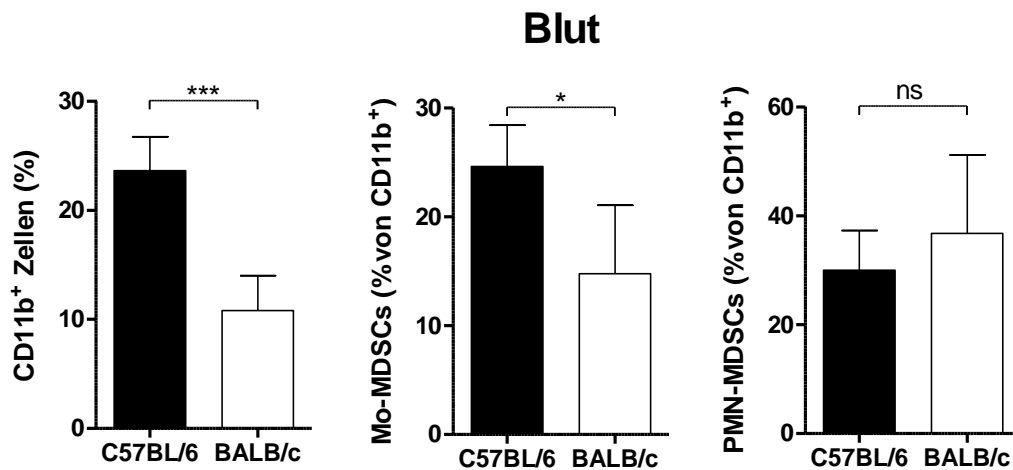
Um festzustellen, ob sich die Zusammensetzung myeloider Zellen in den beiden Mausstämmen C57BL/6 und BALB/c unterscheiden, wurden verschiedene Organe naiver Mäuse analysiert. Dazu wurde das Knochenmark als primäres lymphatisches Organ und Ort der Bildung von myeloiden Zellen herangezogen. Die Knochenmarkszellen sind für die Durchflusszytometrie mit den Oberflächenmarkern CD11b ( $\alpha_M\beta_2$ -Integrin oder *complement receptor 3*, CR3), Ly6C (Lymphozyten Antigen 6, Locus C) und Ly6G (Lymphozyten Antigen 6, Locus G) gefärbt worden. Diese drei Oberflächenproteine erlauben eine Unterscheidung zwischen allen Monozyten/monozyten-ähnliche MDSCs (Mo-MDSCs: CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup>) und neutrophile Granulozyten/ polymorphonukleäre MDSCs (PMN-MDSCs: CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>) (Schmid et al. 2012; Rose et al. 2012). In Abbildung 3.1 sind diese 3 Gruppen myeloider Zellen von naiven C57BL/6- und BALB/c-Mäusen im Knochenmark dargestellt. In BALB/c-Mäusen ist sowohl die prozentuale als auch die Gesamtzellzahl CD11b<sup>+</sup> myeloider Zellen, sowie Mo-MDSCs deutlich weniger als in C57BL/6-Mäusen. Die Anzahl von PMN-MDSCs ist dagegen vergleichbar zwischen den Mausstämmen.



**Abb. 3.1: Zusammensetzung myeloider Zellen im Knochenmark von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen.** Einzelzellsuspensionen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Es sind die

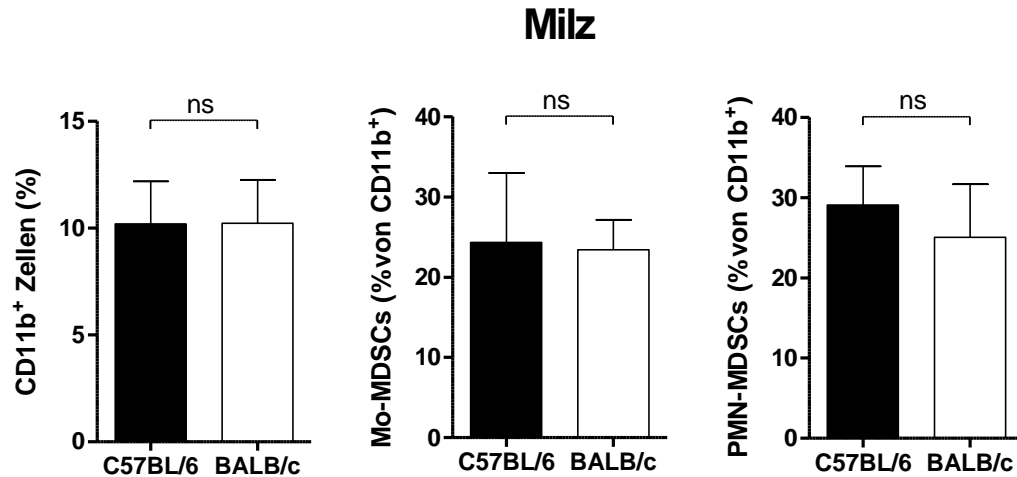
Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=4). Die statistische Auswertung wurde mit dem *unpaired student's t-test* durchgeführt.

Da die meisten Zellen des hämatopoetischen Systems im Knochenmark entstehen und über das Blut in die bestimmten Zielregionen des Körpers gelangen (Cumano und Godin 2007), wurde auch das Blut der Mausstämmen in Bezug auf die Zusammensetzung ihrer myeloiden Zellen verglichen.



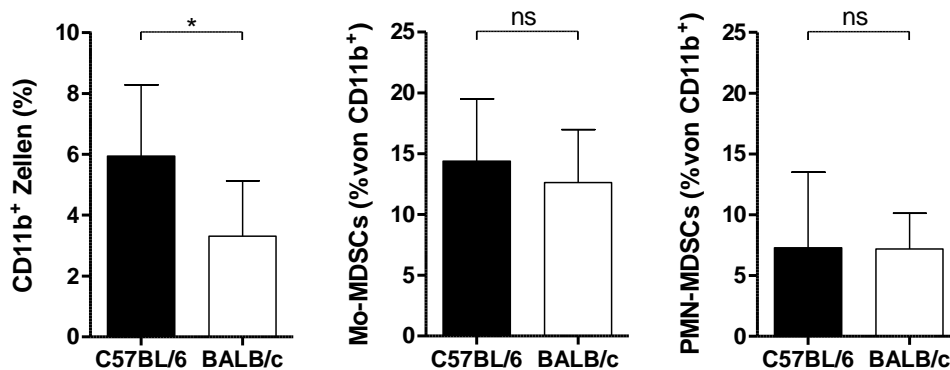
**Abb. 3.2: Zusammensetzung myeloider Zellen im Blut von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen.** Blutzellen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=5). Die statistische Auswertung wurde mit dem *unpaired student's t-test* durchgeführt.

Wie in Abb. 3.2 zu erkennen ist, spiegelt sich der Befund, der im Knochenmark gesehen wurde, auch im Blut wider. Auch hier verfügen BALB/c-Mäuse prozentual über weniger myeloide Zellen und dadurch auch die darin enthaltenen Mo-MDSCs. PMN-MDSCs treten in vergleichbaren Anteilen im Blut auf. Desweiteren sind die sekundären lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten auf einen Unterschied bei der Zusammensetzung myeloider Zellen zwischen C57BL/6- und BALB/c-Mäusen analysiert worden. Abbildung 3.3 zeigt, dass es in der Milz keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich myeloider Zellen gibt. Wenn man hingegen die Zusammensetzung myeloider Zellen im Lymphknoten vergleicht, so gibt es auch hier in BALB/c-Mäusen einen niedrigeren prozentualen Anteil an CD11b<sup>+</sup> Zellen.



**Abb. 3.3: Zusammensetzung myeloider Zellen in der Milz von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen.** Milzzellen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=8). Die statistische Auswertung wurde mit dem *unpaired student's t-test* durchgeführt.

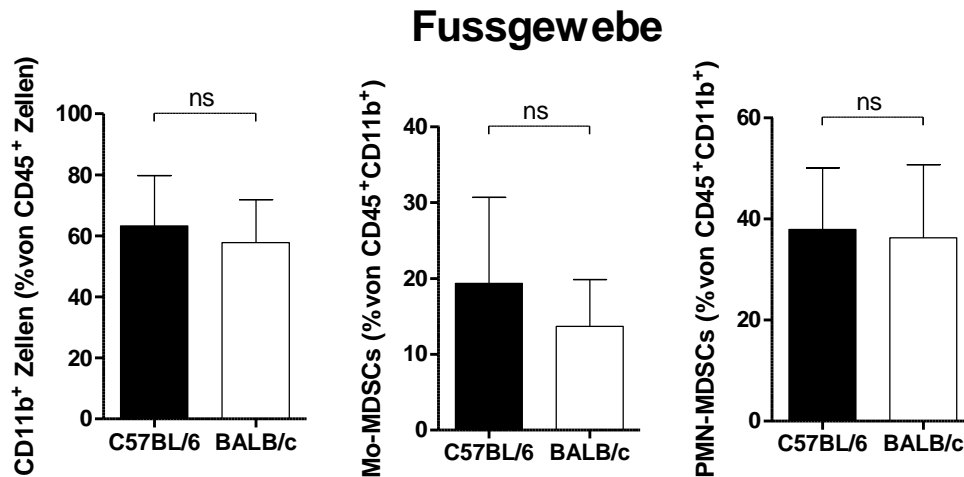
### popliteale Lymphknoten



**Abb. 3.4: Zusammensetzung myeloider Zellen in poplitealen Lymphknoten von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen.** Die Einzelzellsuspensionen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=8). Die statistische Auswertung wurde mit dem *unpaired student's t-test* durchgeführt.

Abschließend ist zu erwähnen, dass im Fussgewebe, also am Ort der Infektion mit Leishmanien, keine Unterschiede im Bezug auf die Verteilung myeloider Subpopulationen festzustellen sind. Zusammenfassend kann aus den erhobenen Ergebnissen gefolgert werden, dass der prozentuale Anteil myeloider Zellen im Knochenmark und Blut von BALB/c-Mäusen generell geringer ist als in C57BL/6-Mäusen. Im Detail konnte weiterhin gezeigt

werden, dass darunter hauptsächlich die Mo-MDSC Subpopulation betroffen ist, im Gegensatz zur PMN-MDSCs. Um diese Befunde zu bestätigen, wurden Milzen, Lymphknoten und Fussgewebe histologisch untersucht.

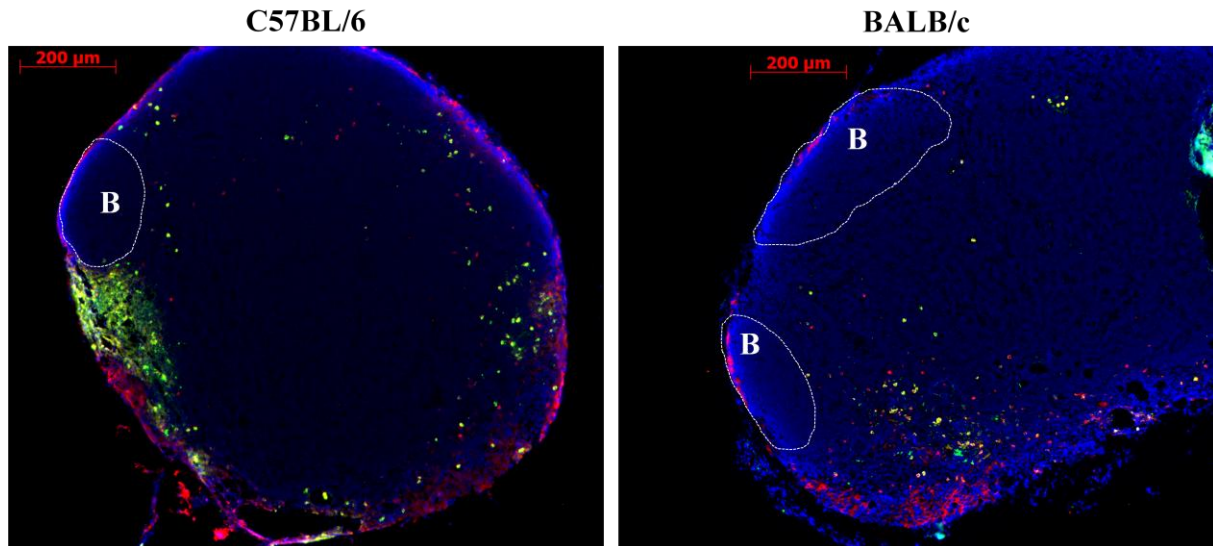


**Abb. 3.5: Zusammensetzung myeloider Zellen im Fussgewebe von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen.** Die Einzelzellsuspensionen wurden mit den Oberflächenmarkern CD45, CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=8). Die statistische Auswertung wurde mit dem *unpaired student's t-test* durchgeführt.

### 3.1.2 Histologische Analyse von poplitealen Lymphknoten aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

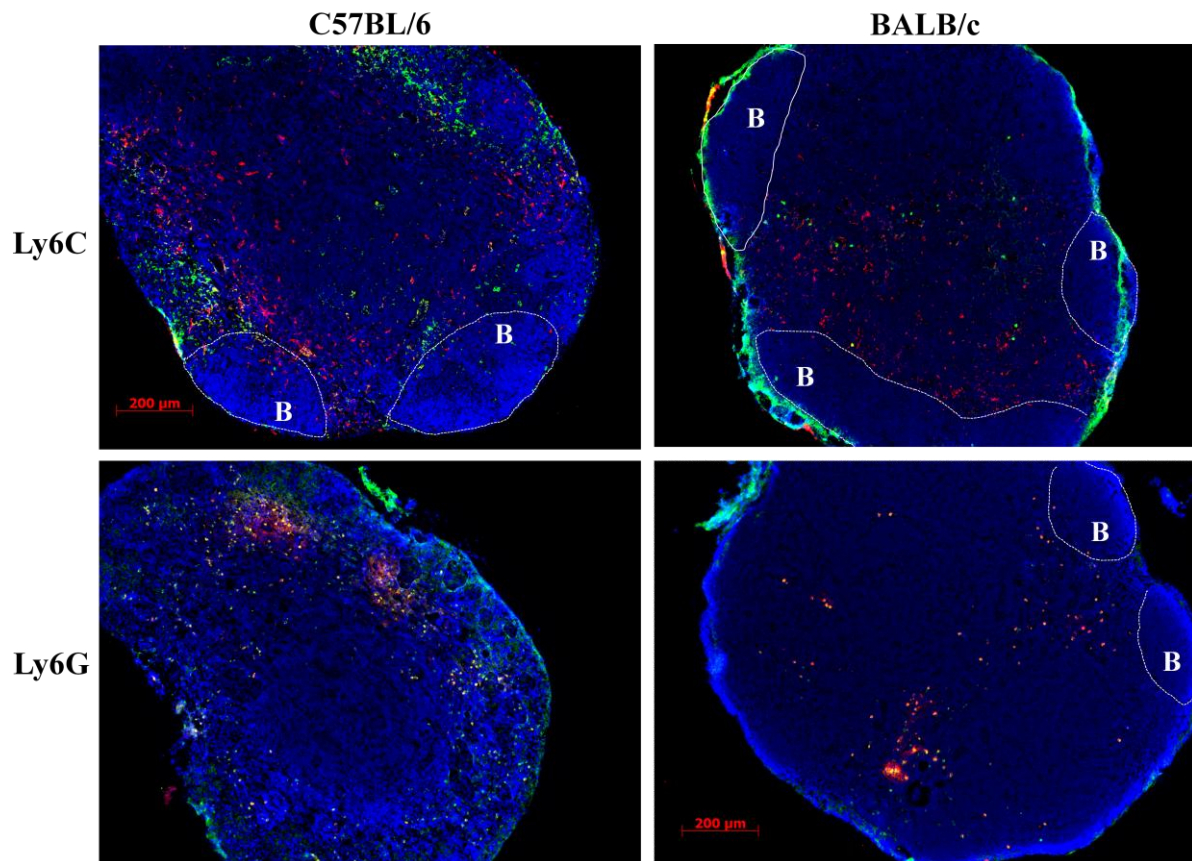
Aufgrund der durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden histologische Schnitte von Lymphknoten angefertigt. Da in der Milz und im Fussgewebe keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung myeloider Zellen in naiven Mäusen festgestellt wurde (siehe 3.1.1), ist der Fokus auf die Analyse der Lymphknoten gelegt worden. In Abb. 3.6 sind Schnitte der poplitealen Lymphknoten dargestellt, die mit Antikörpern gegen CD11b (rot) und Gr-1 (grün) gefärbt wurden. Zusätzlich wurde mit DAPI (blau) eine Färbung der Zellkerne durchgeführt. Bevor MDSCs mit spezifischen Antikörpern gegen Ly6C und Ly6G unterteilt wurden, benutze man Gr-1-Antikörper zur Identifikation von myeloiden Suppressorzellen (Gabrilovich und Nagaraj 2009). Doppelt gefärbte Zellen die sowohl CD11b und Gr-1 exprimieren (gelb), können dadurch als mögliche MDSCs definiert werden. Sowohl in C57BL/6- als auch in BALB/c-Mäusen sind CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> Zellen im naiven Lymphknoten zu finden. Hauptsächlich können MDSCs dabei im medullären und corticalen Bereich lokalisiert werden und weniger in den B-Zellfollikeln (in Abb. 3.6 mit B

gekennzeichnet). Diese Position würde sich als günstig erweisen, sollten diese Zellen beispielsweise T-Zellen in ihrer Proliferation hemmen, da in der Medulla überwiegend T-Zellen vorzufinden sind.



**Abb. 3.6: Histologische Cryostat-Schnitte von poplitealen Lymphknoten aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen.** Die 8µm dicken Schnitte wurden mit CD11b-biotin-Streptavidin AF546 (rot), Gr-1-FITC (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Gr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Zellen werden als gelbe Zellen abgebildet (n=3). B = B-Zellfollikel. Die Aufnahmen wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die Einteilung von MDSC-Subtypen mit den spezifischen Antikörpern Ly6G und Ly6C ermöglicht eine genauere Charakterisierung der CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> Zellen im Lymphknoten. Deshalb wurden sowohl Ly6C (Abb. 3.7 oben) als auch Ly6G (Abb. 3.7 unten) in Kombination mit CD11b auf den histologischen Schnitten gefärbt. Auch für Ly6C<sup>+</sup> und Ly6G<sup>+</sup> Zellen gilt, dass die Lokalisation auf die medullären Bereiche des Lymphknotens beschränkt ist. Bei beiden Färbungen lässt sich eine Tendenz erkennen, dass sich in C57BL/6-Mäusen mehr CD11b<sup>+</sup> und Ly6C<sup>+</sup> Zellen bzw. Ly6G<sup>+</sup> Zellen nachweisen lassen als in BALB/c-Mäusen.



**Abb. 3.7: Histologische Cryostat-Schnitte von poplitealen Lymphknoten aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen.** Die 8µm dicken Schnitte wurden mit CD11b-biotin-Streptavidin AF546 (grün), Ly6C-AF647 (rot, oben), Ly6G-AF647 (rot, unten) und DAPI (blau) gefärbt. CD11b<sup>+</sup> Zellen, die zusätzlich Ly6C<sup>+</sup> bzw. Ly6G<sup>+</sup> sind, werden als gelbe Zellen abgebildet. B = B-Zellfollikel. Die Aufnahmen wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die in 3.1.1 und 3.1.2 geschilderten Befunde, geben Hinweise darauf, dass sich C57BL/6- und BALB/c-Mäuse hinsichtlich ihrer myeloiden Zellfraktion unterscheiden. Da sich die größten Unterschiede im Knochenmark und im Blut nachweisen ließen, wurde im nächsten Abschnitt untersucht, inwiefern sich der genetische Hintergrund der Maus auf das Differenzierungspotential von Knochenmarkszellen zu MDSCs auswirkt.

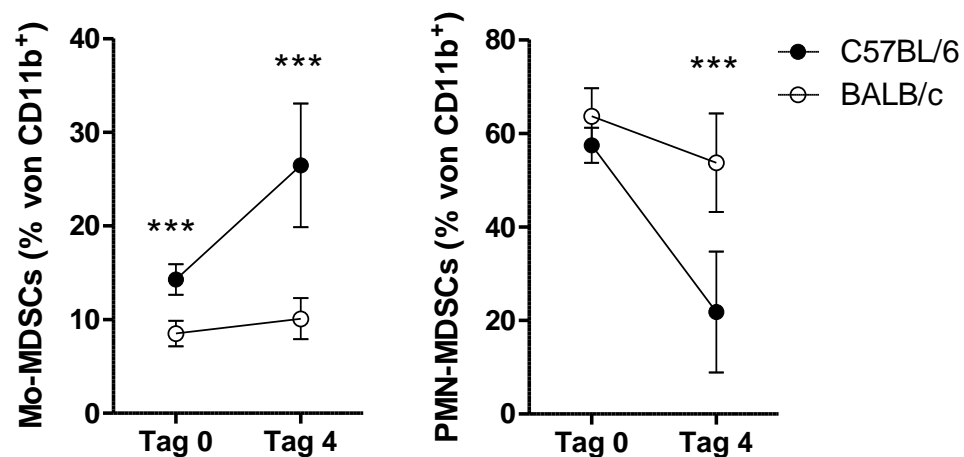
## 3.2 *in vitro* Charakterisierung von MDSCs in der Leishmaniose

### 3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse von *in vitro* generierten MDSCs

Bei dem in 3.1.1 gezeigten Ergebnis im Knochenmark, ist nicht auszuschließen, dass verschiedene GM-CSF Konzentrationen in den Mausstämmen vorhanden sind. Um dies zu umgehen, wurden *in vitro* MDSCs aus Knochenmarkszellen in GM-CSF-haltigem Medium



generiert (siehe 2.2.1.10). Nach 4 Tagen Kultivierung, wurden die Zellen auf die Zusammensetzung der MDSC-Subpopulationen durchflusszytometrisch untersucht. Wie in Abb. 3.8 dargestellt, gibt es gravierende Unterschiede zwischen den Mausstämmen. An Tag 4 der Differenzierungsphase sind einerseits signifikant mehr Mo-MDSCs in den Zellkulturen von C57BL/6-Knochenmarkzellen vorzufinden im Vergleich zu BALB/c-Zellen. Andererseits sind signifikant mehr PMN-MDSCs in den Kulturen von BALB/c-Zellen vorhanden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht nur im Knochenmark der Mäuse diese Unterschiede vorhanden sind, sondern dass es auch in der Differenzierungsphase von myeloiden Zellen enorme Unterschiede gibt. Die Fähigkeit der Knochenmarkzellen zur Differenzierung zu MDSCs ist folglich nicht auf unterschiedliche GM-CSF Konzentrationen im Knochenmark zurückzuführen, sondern auf ein unterschiedliches genetisches Programm der Mausstämmen, auf einen GM-CSF Stimulus zu reagieren. Ausgeschlossen ist auch die Möglichkeit einer ungleichen Zellzahl in den Zellkulturschalen, da hier vergleichbare Gesamtzellzahlen bei C57BL/6-Zellen und BALB/c-Zellen an Tag 4 ermittelt wurden (Daten nicht gezeigt).

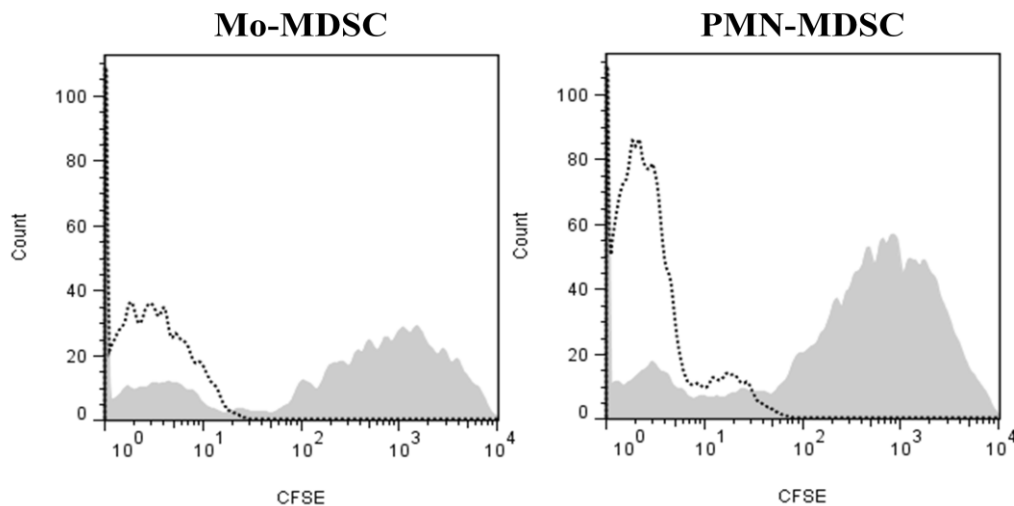


**Abb. 3.8: Durchflusszytometrische Analyse von *in vitro* kultivierten Knochenmarkzellen mit GM-CSF.** Die Einzellsuspensionen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=6). Die statistische Auswertung wurde mit dem *unpaired student's t-test* durchgeführt.

Die auf diese Weise generierten MDSCs wurden weiter untersucht, um festzustellen, inwiefern die Unterschiede bezüglich der Fähigkeit zur Weiterdifferenzierung Einfluss auf die Wirtszellen-Pathogen Interaktionen haben.

### 3.2.2 Ko-Kultur von CFSE-markierten *L. major* mit *in vitro* generierten MDSCs

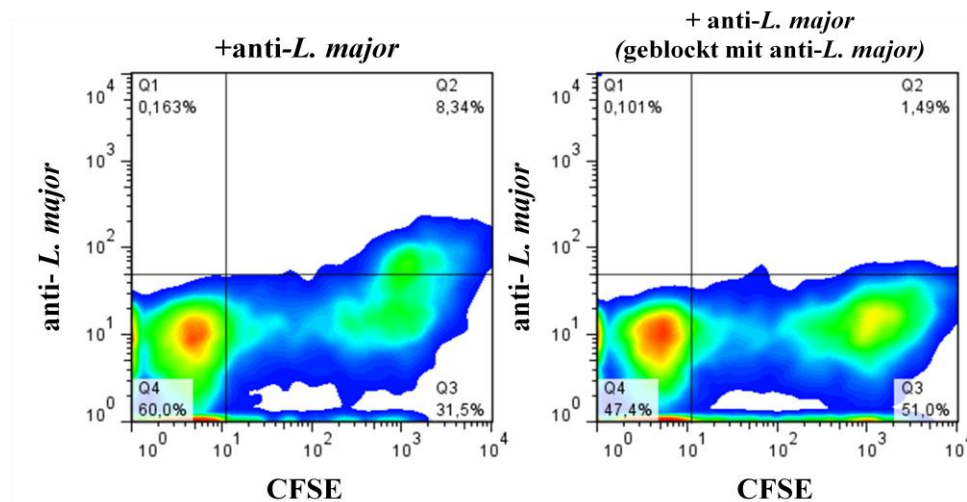
Für den obligat intrazellulären Parasit *L. major*, sind myeloide Zellen die notwendige Zellgruppe für die Replikation und für das Überleben des Krankheitserregers (Ritter et al. 2009; Bogdan und Röllinghoff 1999). Daher ist es nicht auszuschließen, dass MDSCs als unreife myeloide Zellen ebenfalls als Proliferationsort für Leishmanien dienen können. Um diese Frage zu beantworten, wurden *in vitro* generierte MDSCs an Tag 3 für 12 Stunden mit CFSE-markierten *L. major* in einem Verhältnis von 1:10 ko-kultiviert (siehe 2.2.1.17).



**Abb. 3.9: Ko-Kultur von *in vitro* MDSCs (C57BL/6) mit CFSE-markierten *L. major*.** *In vitro* MDSCs wurden an Tag 3 der Differenzierung mit GM-CSF für 12 Stunden mit CFSE-markierten *L. major* inkubiert. An Tag 4 wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie mit CD11b, Ly6G und Ly6G gefärbt. Abgebildet sind Mo-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen, PMN-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup> und deren Histogramm-Profil im FITC-Kanal (entspricht den CFSE-gefärbten Leishmanien). Die gepunktete Linie zeigt MDSCs ohne Leishmanien Ko-Kultur, grau schattiert sind MDSCs mit *L. major* Inkubation.

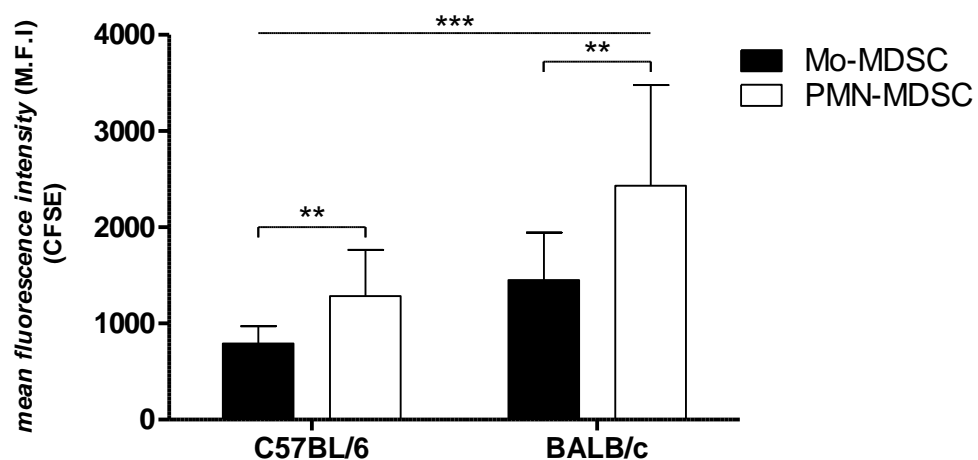
In Abb. 3.9 wird gezeigt, ob *in vitro* MDSCs generell mit *L. major* interagieren. Den beiden Histogrammen ist zu entnehmen, dass sowohl Mo-MDSCs als auch PMN-MDSCs in der Lage sind Leishmanien zu phagozytieren bzw. die Parasiten mit MDSCs interagieren können. Es konnte dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Leishmanien nur extrazellulär an den MDSCs anhaften. Dazu wurde ein zusätzlicher Antikörper gegen *L. major* zur FACS-Färbung hinzugefügt. Als intrazelluläre (= phagozytierte) Leishmanien, wurden CFSE<sup>+</sup> Zellen gewertet, die sich nicht mit dem anti- *L. major* Antikörper färben ließen (Abb. 3.10, links Gate Q3). Als Kontrolle wurde eine Probe vor der Oberflächenfärbung mit einem unmarkierten anti-*L. major* Antikörper blockiert, so dass mit dem Cy5-konjugierten anti- *L. major* Antikörper keine positiven Signale mehr detektierbar waren (Abb. 3.10, rechts

Q2). Aus dieser Färbestrategie konnte ermittelt werden, dass der größte Teil (~80%) der Leishmanien intrazellulär in MDSCs vorhanden sind.



**Abb. 3.10: Ko-Kultur von *in vitro* MDSCs (C57BL/6) mit CFSE-markierten *L. major*.** *In vitro* MDSCs wurden an Tag 3 der Differenzierung mit GM-CSF für 12 Stunden mit CFSE-markierten *L. major* inkubiert. An Tag 4 wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie mit CD11b, Ly6G und anti-*L. major* (links) gefärbt oder vor der Färbung mit unkonjugierten anti-*L. major* Antikörper blockiert (rechts).

Basierend auf diesen Erkenntnissen, wurden sowohl *in vitro* generierte Mo-MDSCs als auch PMN-MDSCs aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen auf ihre Fähigkeit untersucht *L. major* Parasiten zu phagozytieren. In Abb. 3.11 wurde dabei die *mean florescence intensity* des CFSE-Signals ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass *in vitro* MDSCs, die aus BALB/c-Mäusen generiert wurden, ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal aufweisen als C57BL/6-MDSCs, was auf phagozytierte Leishmanien zurückzuführen ist.



**Abb. 3.11: Ko-Kultur von *in vitro* MDSCs aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen mit CFSE-markierten *L. major*.** *In vitro* MDSCs wurden an Tag 3 der Differenzierung mit

GM-CSF für 12 Stunden mit CFSE-markierten *L. major* inkubiert. An Tag 4 wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie mit CD11b, Ly6G und Ly6C gefärbt. Abgebildet ist die M.F.I des CFSE-Signals von Mo-MDSCs (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup>) und PMN-MDSCs (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>). Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit zusätzlichem Bonferroni-Post-Test).

Desweiteren finden sich in PMN-MDSCs mehr Parasiten als in Mo-MDSCs. Ob die beiden myeloiden Subtypen durch diese Interaktionen mit den Parasiten auf molekularer Ebene beeinflusst werden Effektormoleküle zu produzieren, wurde im folgenden Abschnitt mittels PCR untersucht.

### 3.2.3 iNOS und Arginase-1 Expression von *in vitro* generierten MDSCs

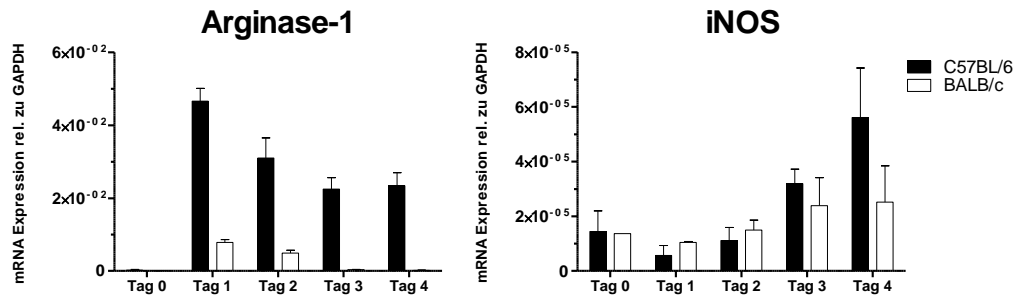
Wie in 1.5 beschrieben, verfügen myeloide Suppressorzellen über verschiedene Mechanismen, um eine Immunantwort zu hemmen. Zum einen geschieht dies über eine erhöhte Arginase-1 Expression, die zu einer Depletion der Aminosäure L-Arginin im umgebenden Gewebe führt, zum anderen wird iNOS verstärkt exprimiert, was einen Anstieg des toxischen NO zur Folge hat. Dadurch kann eine T-Zellproliferation maßgeblich beeinträchtigt werden.

#### 3.2.3.1 iNOS und Arginase-1 Expression während der Differenzierung mit GM-CSF

Um zu zeigen, dass *in vitro* generierte MDSCs diese suppressiven Faktoren bilden können, wurde die mRNA Expression von Arginase-1 und iNOS bestimmt. In Abb. 3.12 ist bei C57BL/6-Mäusen während der 4-tägigen Inkubation mit GM-CSF eine Expression der beiden Enzyme zu erkennen, wohingegen in MDSCs aus BALB/c-Mäusen kaum Arginase-1 und nur eine schwache iNOS Expression detektierbar ist. Herauszustellen ist hier, dass bei MDSCs aus C57BL/6-Mäusen die Arginase-1 Expression während der Differenzierung mit GM-CSF abnimmt und die iNOS Transkription dagegen stetig steigt. Da an Tag 4 beschrieben ist, dass *in vitro* generierte MDSCs suppressive Eigenschaften besitzen (Rößner et al. 2005), wurde weiterhin geprüft, ob eine Ko-Kultur mit Leishmanien einen Einfluss auf die mRNA Expression der beiden Enzyme hat.

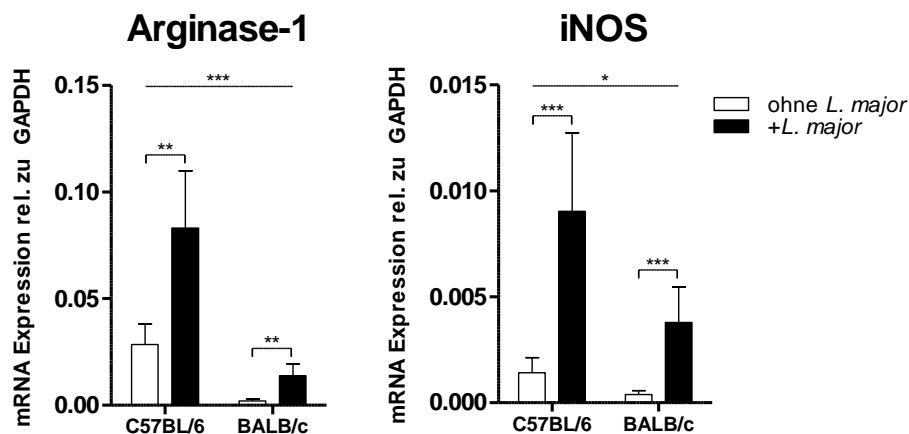
#### 3.2.3.2 iNOS und Arginase-1 Expression während *L. major* Ko-Kultur

Wie sich in 3.2.2 herausstellte, können *L. major* Parasiten mit *in vitro* MDSCs interagieren und von ihnen auch phagozytiert werden. Deshalb wurde untersucht, inwiefern sich die



**Abb. 3.12: Kinetik der Arginase-1 und iNOS Expression von *in vitro* generierten MDSCs aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen.** *In vitro* generierte MDSCs wurden 4 Tage mit GM-CSF differenziert.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden an den jeweiligen Tagen für eine qRT-PCR zur Analyse der Arginase-1 und iNOS Expression herangezogen. Es ist die mRNA Expression relativ zu GAPDH dargestellt. Für die Berechnung wurde die  $\Delta\text{ct}$ -Methode angewendet. Das Experiment wurde einmal durchgeführt, die Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf 3 technische Replikate.

Expression von Arginase-1 und iNOS verändert, wenn Leishmanien mit MDSCs inkubiert wurden. Wie sich herausgestellt hatte, erfolgte durch die Ko-Kultur mit Leishmanien in MDSCs eine Induktion sowohl von Arginase-1 als auch iNOS mRNA. Dies war in C57BL/6- und BALB/c-MDSCs der Fall, jedoch ist die Induktion der Enzyme in MDSCs, die aus BALB/c-Mäusen generiert wurden, signifikant geringer.

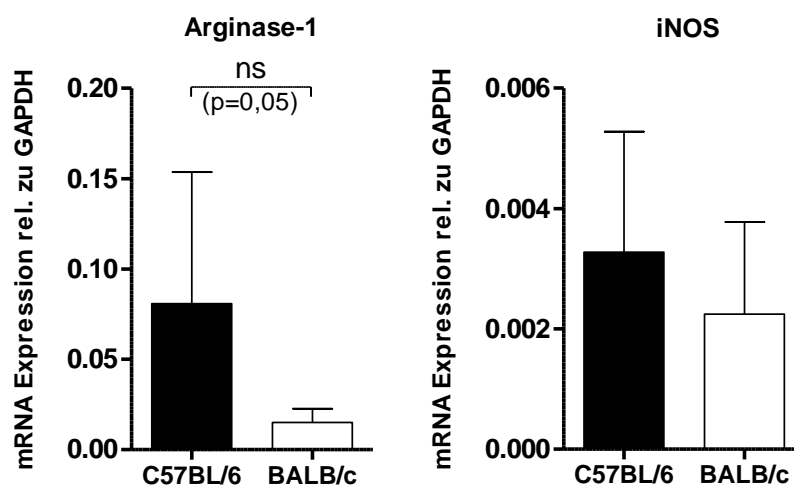


**Abb. 3.13: Arginase-1 und iNOS Expression von *in vitro* generierten MDSCs aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach *L. major* Infektion.** Gesamte *in vitro* generierte MDSCs wurden ohne *L. major* oder mit 12-stündiger Ko-Kultur inkubiert.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden für eine qRT-PCR zur Analyse der Arginase-1 und iNOS Expression herangezogen. Es ist die mRNA Expression relativ zu GAPDH dargestellt. Für die Berechnung wurde die  $\Delta\text{ct}$ -Methode angewendet. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit zusätzlichem Bonferroni-Post-Test).

Bei den in 3.2.3.1 und 3.2.3.2 beschriebenen RT-PCR Analysen wurden nur gesamte MDSC-Populationen verwendet. Daher wurde weiterhin untersucht, ob aufgereinigte Mo-MDSCs eine Arginase-1 und iNOS Expression zeigen.

### 3.2.3.3 Arginase-1 und iNOS Expression in Mo-MDSCs

Mit der in 2.2.1.12 beschriebenen Sortierung von Zellsuspensionen mittels eines FACSAria Durchflusszytometers, wurden *in vitro* generierte MDSCs in die beiden Subtypen Mo-MDSC und PMN-MDSC aufgetrennt. Nach der Isolierung der RNA aus diesen Populationen zeigte sich jedoch, dass nur bei Mo-MDSCs ausreichende Mengen an RNA gewonnen werden konnten, um eine qRT-PCR durchzuführen. Deshalb beschränkt sich die Analyse der suppressiven Moleküle Arginase-1 und iNOS auf die CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6G<sup>high</sup> Population. Der Abb. 3.14 ist zu entnehmen, dass beide Enzyme in Mo-MDSCs aus C57BL/6-Mäusen nachweisbar sind. Mo-MDSCs aus BALB/c-Mäusen dagegen, zeigen eine geringere Arginase-1 Expression als in C57BL/6-Zellen. Die iNOS Expression der Mo-MDSCs ist allerdings bei beiden Mausstämmen in vergleichbaren Mengen nachzuweisen.



**Abb. 3.14: Arginase-1 und iNOS Expression von *in vitro* generierten Mo-MDSCs aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen.**  $5 \times 10^6$  durchflusszytometrisch sortierte *in vitro* generierte Mo-MDSCs wurden für eine qRT-PCR zur Analyse der Arginase-1 und iNOS Expression herangezogen. Es ist die mRNA Expression relativ zu GAPDH dargestellt. Für die Berechnung wurde die  $\Delta\text{ct}$ -Methode angewendet. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=2). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem *unpaired student's t-test*.

Es ist also erwiesen, dass diese Zellpopulationen suppressive Faktoren produzieren können und die Expression durch Leishmanien beeinflusst wird. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob diese Zellen eine T-Zellproliferation aktiv hemmen können.

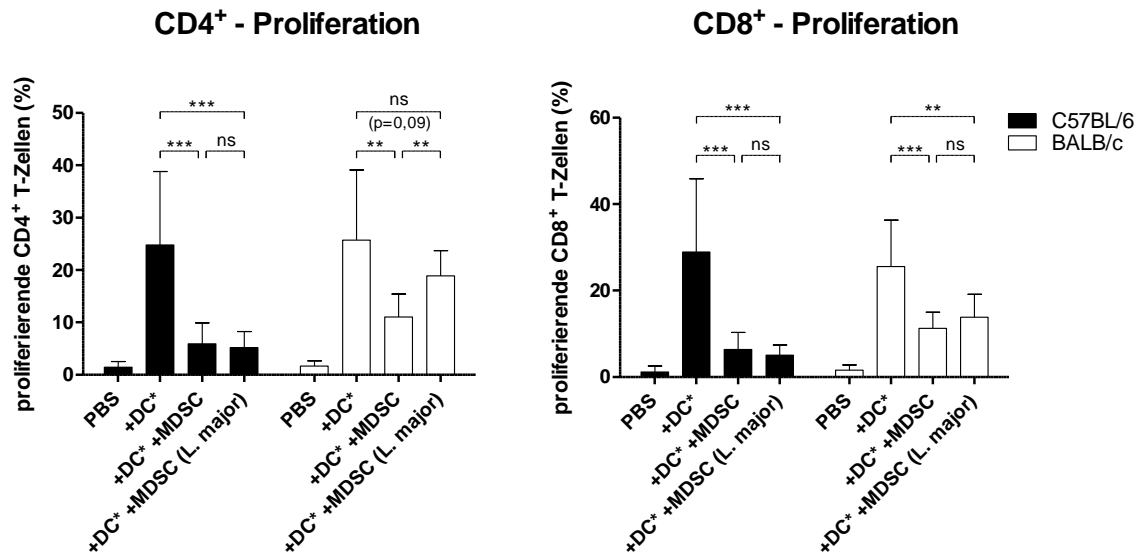
### **3.2.4 Leishmanienantigen-spezifischer Suppressionsassay mit *in vitro* generierten MDSCs**

Aus den bisherigen Daten geht hervor, dass *in vitro* generierte MDSCs mit Leishmanien interagieren können und infolgedessen suppressive Moleküle wie Arginase-1 und iNOS verstärkt produzieren. Ob diese Zellen in der Lage sind, aktiv eine T-Zellproliferation zu beeinträchtigen, wurde in den folgenden Abschnitten untersucht.

Zur Analyse der suppressiven Eigenschaften von *in vitro* generierten MDSCs wurden T-Zellen aus infizierten Mäusen mittels löslichen Leishmanien-Antigen (SLA) zur Proliferation angeregt. Damit die Reaktionsbedingungen so ähnlich sind, wie in der *in vivo* Situation, wurden BMDCs als antigenpräsentierende Zelle verwendet, um das SLA zu prozessieren und den T-Zellen präsentieren zu können (siehe 2.2.1.19).

#### **3.2.4.1 Einfluss auf die Funktionalität von *in vitro* generierten MDSCs durch *L. major***

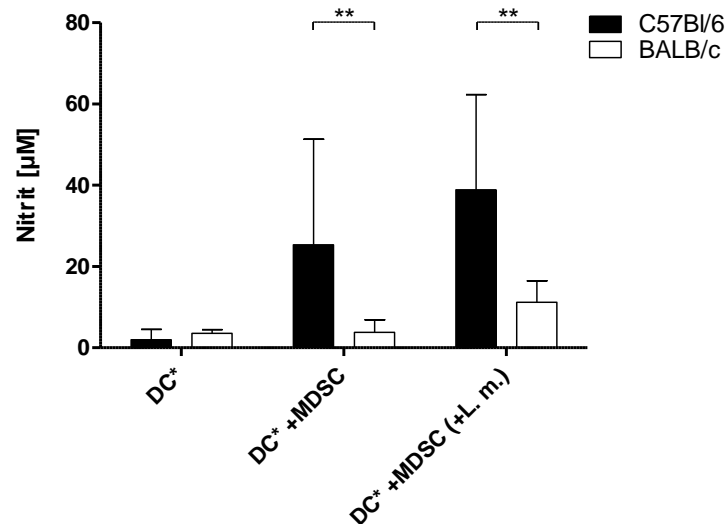
Im beschriebenen Suppressionsassay wurden die suppressiven Eigenschaften von *in vitro* generierten MDSCs untersucht. In Abb. 3.15 ist sowohl die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. MDSCs aus beiden Mausstämmen können unter diesen Bedingungen eine Leishmanienantigen-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen supprimieren. Um festzustellen, inwiefern lebende *L. major* Parasiten die Suppressivität beeinflusst, wurden MDSCs und Leishmanien ko-kultiviert und anschließend in einem Suppressionassay verwendet.



**Abb. 3.15: Leishmanienantigen-spezifischer Suppressionsassay.** Aus Lymphknoten von infizierten C57BL/6- und BALB/c-Mäusen wurden CD3<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Als antigenpräsentierende Zellen wurden BMDCs an Tag 10 verwendet, die über Nacht mit SLA stimuliert wurden (DC\*). T-Zellen, BMDCs und MDSCs wurden in einem Verhältnis von 10:1:10 ko-kultiviert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=6). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem *unpaired student's t-test*.

Bei MDSCs aus C57BL/6-Mäusen konnte keine Veränderung des suppressiven Potentials beobachtet werden. Betrachtet man allerdings MDSCs aus BALB/c-Mäusen, so kann ein Verlust der Suppressivität gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden. Dieser Effekt ist bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht nachzuweisen. Damit ist bewiesen, dass Leishmanien die Funktionalität von MDSCs aus BALB/c-Mäusen modulieren können. Zusätzlich wurde mit der Griess-Reaktion der Nitrit-Gehalt in den Überständen der Suppressionsassays untersucht, um einen Hinweis auf die iNOS-Aktivität zu erhalten. In Abb. 3.16 ist zu sehen, dass in den Ko-Kulturen von C57BL/6-Zellen signifikant mehr Nitrit detektierbar ist, als in Suppressionsassays aus BALB/c-Mäusen. Wenn MDSCs vor dem Assay mit *L. major* inkubiert worden sind, konnte keine signifikante Veränderung weder bei BALB/c noch bei C57BL/6 festgestellt werden. Dieses Ergebnis, deutet auf eine erniedrigte iNOS-Aktivität in MDSCs aus BALB/c-Mäusen hin, obwohl eine T-Zellproliferation noch ausreichend gehemmt wird. Da MDSCs aus BALB/c-Mäusen nach einer Ko-Kultur mit Leishmanien ihre Suppressivität gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen verlieren, aber sowohl die iNOS-Expression als auch die iNOS-Aktivität gesteigert wird, muss der suppressive Effekt in BALB/c-Mäusen über einen anderen Mechanismus stattfinden.





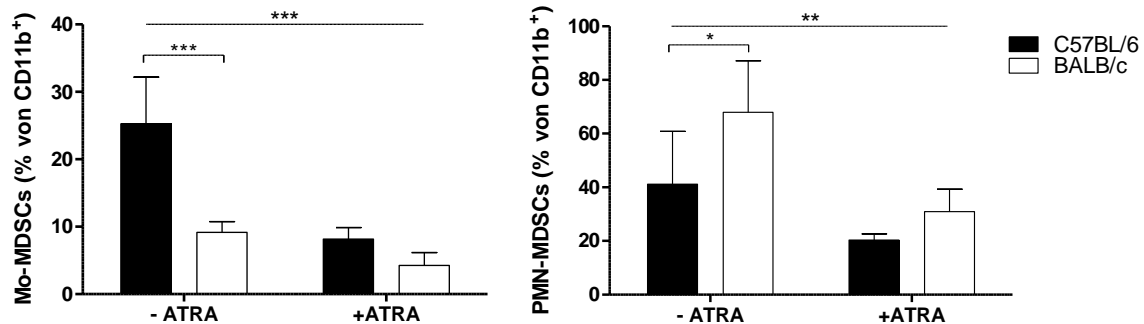
**Abb. 3.16: Nitrit-Gehalt in Überständen von Leishmanienantigen-spezifischen Suppressionsassays.** In Überständen der in 2.2.1.19 beschriebenen Suppressionsassay wurde der Nitrit-Gehalt mit der Griess-Reaktion nachgewiesen (2.2.1.20). Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=4). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit zusätzlichem Bonferroni-Post-Test).

Der Frage, ob *in vitro* generierte MDSCs durch eine induzierte Differenzierung mit einem extrazellulären Stimulus ihre suppressiven Eigenschaften verlieren, wurde im nächsten Abschnitt nachgegangen.

#### 3.2.4.2 Einfluss auf die Funktionalität von *in vitro* generierten MDSCs durch Differenzierung mit *all-trans* Retinsäure (ATRA)

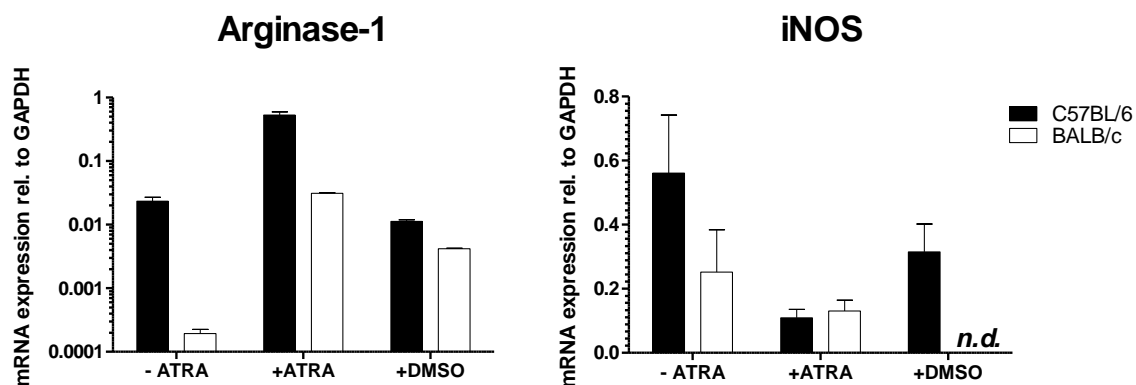
In der Publikation von Pereira et al. wird beschrieben, dass durch die Behandlung von Mäusen mit *all-trans* Retinsäure (ATRA) unreife MDSCs depletiert werden, indem sie differenzieren. ATRA nimmt eine zentrale Rolle in der Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu Granulozyten ein (Gaines und Berliner 2003; Taschner et al. 2006), wohingegen es widersprüchliche Studien über die Funktion von ATRA für die Differenzierung von Monozyten gibt. In einer Studie wird gezeigt, dass ATRA bei Krebspatienten die Anzahl an unreifen myeloiden Zellen (zu denen auch MDSCs zugeordnet werden) verringert (Mirza 2006). Im Gegensatz dazu wird in einer anderen Publikation gezeigt, dass ATRA die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen unter GM-CSF inhibiert (Sousa-Canavez et al. 2009). Deshalb wurde zunächst überprüft, wie ATRA die Entwicklung von *in vitro* MDSCs während der GM-CSF Inkubation beeinflusst. In Abb. 3.17

sind Mo-MDSCs und PMN-MDSCs an Tag 4 der Differenzierungsphase auf ihre prozentuale Zusammensetzung in der Kultur analysiert worden.



**Abb. 3.17: Stimulation von *in vitro* MDSCs mit ATRA.** *In vitro* MDSCs wurden 4 Tage mit oder ohne ATRA (2 $\mu$ M) und GM-CSF inkubiert. An Tag 4 wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie mit CD11b, Ly6G und Ly6C gefärbt. Abgebildet ist der prozentuale Anteil von Mo-MDSCs oder PMN-MDSCs unter CD11b<sup>+</sup> Zellen. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=2). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA.

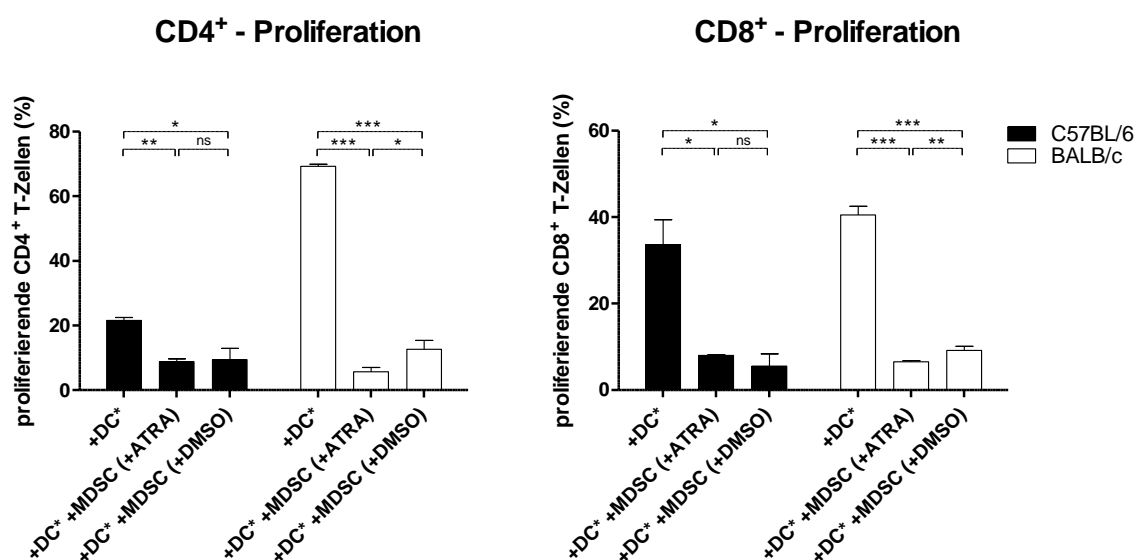
Es ist deutlich zu erkennen, dass ATRA sowohl den Anteil an Mo-MDSCs, sowie PMN-MDSCs signifikant in C57BL/6- und BALB/c-Kulturen erniedrigt. Diese Daten deuten darauf hin, dass die unreifen Vorläuferzellen mittels ATRA durch Differenzierung in den Kulturen deutlich geringer sind. Auch auf molekularer Ebene wurde untersucht, wie ATRA Einfluss auf die Expression der Enzyme Arginase-1 und iNOS nimmt.



**Abb. 3.18: Arginase-1 und iNOS Expression von *in vitro* generierten MDSCs aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen mit und ohne ATRA Stimulation.** *In vitro* generierte MDSCs wurden für 4 Tage mit oder ohne ATRA (2 $\mu$ M) inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellen 4 Tage mit DMSO (entsprechendes Volumen wie 2 $\mu$ M ATRA) inkubiert. 5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden für eine qRT-PCR zur Analyse der Arginase-1 und iNOS Expression herangezogen. Es ist die mRNA Expression relativ zu GAPDH dargestellt. Für die Berechnung wurde die  $\Delta$ ct-Methode angewendet. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=1, 3 technische Replikate). n.d. = nicht detektierbar.

Wie in Abb. 3.18 dargestellt, beeinflusst ATRA die Arginase-1 und iNOS mRNA-Expression. In C57BL/6- und BALB/c-MDSCs wird durch ATRA die Arginase-1 Expression stark erhöht, die Transkription von iNOS-mRNA wird dagegen erniedrigt. Auffällig ist allerdings, dass bereits eine Inkubation der Zellen aus BALB/c-Mäusen mit DMSO (in dem ATRA gelöst wurde) eine Induktion von Arginase-1-mRNA verursacht. Dieser Effekt ist bei C57BL/6-Mäusen nicht zu erkennen, da hier die Arginase-1 Expression in unstimulierten MDSCs bereits deutlich über dem von BALB/c-MDSCs ist. Da diese beiden Enzyme eine entscheidende Rolle bei der Suppression von proliferierenden T-Zellen spielen, gilt es nun nachzuweisen, inwiefern die Suppressivität der MDSCs durch die erniedrigte iNOS- und erhöhte Arginase-1-Expression verändert wird.

Aufgrund der in 3.17 und 3.18 gezeigten Tendenz, dass Knochenmarkszellen an Tag 4 mit ATRA einen differenzierteren Phänotyp zeigen als unstimulierte MDSCs, stellte sich die Frage, ob diese Zellen weiterhin suppressiv sind. Dazu wurde der in 3.2.4 gezeigte Suppressionsassay verwendet. In Abb. 3.19 ist zu sehen, dass unbehandelte MDSCs sowohl eine  $CD4^+$  also  $CD8^+$  T-Zellproliferation hemmen. Wurden die MDSCs während der 4-tägigen Differenzierungsphase zusätzlich mit ATRA inkubiert, zeigte sich keine Änderung der Suppressivität der Zellen.



**Abb. 3.19: Leishmanienantigen-spezifischer Suppressionsassay mit ATRA stimulierten MDSCs.** Aus Lymphknoten von infizierten C57BL/6- und BALB/c-Mäusen wurden  $CD3^+$  T-Zellen isoliert. Als antigenpräsentierende Zellen wurden BMDCs an Tag 10 verwendet, die über Nacht mit SLA inkubiert wurden. MDSCs wurden mit oder ohne ATRA ( $2\mu M$ ) für 4 Tage inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden MDSCs mit DMSO (entsprechendes Volumen wie  $2\mu M$  ATRA) für 4 Tage inkubiert. T-Zellen, BMDCs und MDSCs wurden in einem Verhältnis von 10:1:10 ko-kultiviert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet ( $n=2$ , wobei ein Experiment mit 3 technischen Replikaten exemplarisch gezeigt ist). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem *unpaired student's t-test*.

In BALB/c-Mäusen ist vielmehr eine Steigerung der Suppressivität zu sehen, da mit ATRA stimulierte MDSCs gegenüber der Negativ-Kontrolle mit DMSO behandelten MDSCs, signifikant verstärkt eine T-Zellproliferation supprimieren. Dieser Befund korreliert mit der erhöhten Arginase-1 Expression in BALB/c-MDSCs. In C57BL/6-MDSCs reicht vermutlich die Induktion von Arginase-1 durch ATRA nicht mehr aus, um eine stärkere Suppression hervorzurufen. Es scheint also Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen in Bezug auf die suppressiven Faktoren zu geben. Allerdings kann *in vitro*, wie in der Studie von (Pereira et al. 2011) gezeigt wird, keine Aufhebung der Suppressivität durch ATRA nachvollzogen werden.

Um genauer herauszustellen welche Mechanismen in den beiden Maussystemen wirken, wurden spezifische Inhibitoren für Arginase-1 und iNOS eingesetzt.

### 3.2.4.3 Einfluss auf die Funktionalität von *in vitro* generierten MDSCs durch Arginase-1- und iNOS-Inhibitoren

Um zu ermitteln welche Effektormoleküle für die Suppression einer Leishmanienantigen-spezifischen T-Zellproliferation verantwortlich sind, wurden die spezifischen Inhibitoren L-NIL (iNOS) und nor-NOHA (Arginase-1) verwendet. Während der 3-tägigen T-Zellproliferation wurden entweder L-NIL oder nor-NOHA in einem Suppressionsassay eingesetzt.

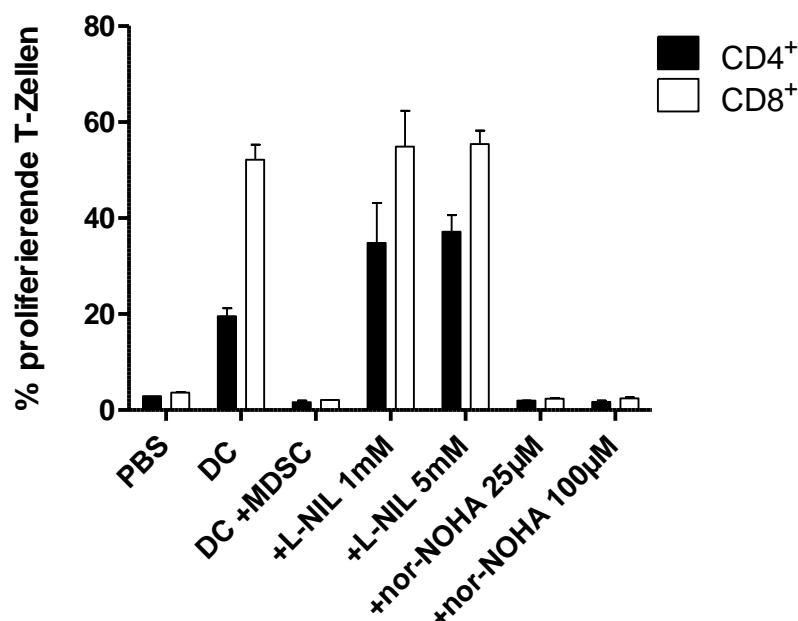


Abb. 3.20: Leishmanienantigen-spezifischer Suppressionsassay mit Arginase-1- und iNOS-Inhibitoren (C57BL/6). Aus Lymphknoten von infizierten C57BL/6-Mäusen wurden CD3<sup>+</sup> T-

Zellen isoliert. Als antigenpräsentierende Zellen wurden BMDCs an Tag 10 verwendet, die über Nacht mit SLA stimuliert wurden. T-Zellen, BMDCs und MDSCs wurden in einem Verhältnis von 10:1:10 mit oder ohne L-NIL (1mM oder 5mM) und nor-NOHA (25µM oder 100µM) ko-kultiviert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=1; es sind 3 technische Replikate gezeigt).

Wie Abb. 3.20 zu entnehmen ist, konnte die Suppression durch den iNOS-Inhibitor L-NIL aufgehoben werden. Der Arginase-1 spezifische Inhibitor nor-NOHA konnte die Suppression dagegen nicht beeinflussen. Auch durch eine Erhöhung der Konzentrationen des Inhibitors konnte kein Effekt auf die Suppression von T-Zellen nachgewiesen werden. Es konnten leider keine Aussagen über Suppressionsassays aus BALB/c-Mäusen getroffen werden.

Mit diesem Experiment konnte die *in vitro* Charakterisierung der MDSCs abgeschlossen werden und es sind folgende Befunde herauszustellen. *In vitro* generierte MDSCs aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen unterscheiden sich erheblich in ihrer Fähigkeit zu Mo-MDSCs oder PMN-MDSCs zu differenzieren. Knochenmarkzellen aus BALB/c-Mäusen entwickeln signifikant weniger Mo-MDSCs als aus C57BL/6-Mäusen. Ebenso unterschiedlich sind die Phagozytose-Eigenschaften der MDSCs. BALB/c-MDSCs können in einem höherem Maße *L. major* Parasiten aufnehmen oder sind nicht in der Lage die Leishmanien abzutöten. Der Subtyp der PMN-MDSCs ist dabei in beiden Mausstämmen die Zellgruppe mit den höheren Phagozytose-Raten. Auf molekularer Ebene setzen sich diese Beobachtungen fort. In MDSCs aus C57BL/6-Mäusen nimmt die Arginase-1 Expression während der 4-tägigen Reifung unter GM-CSF ab und die iNOS Transkription dagegen stetig zu. In BALB/c-MDSCs werden die Enzyme dagegen kaum exprimiert. Werden die MDSCs zusätzlich mit Leishmanien ko-kultiviert nimmt die Expression von beiden Enzymen sowohl in BALB/c- als auch C57BL/6-MDSCs zu. Dabei ist die Expression der Zellen aus BALB/c-Mäusen geringer als in C57BL/6-MDSCs.

Bezüglich der Suppressivität der MDSCs stellte sich heraus, dass Suppressorzellen aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen eine CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellproliferation hemmen können. Myeloide Suppressorzellen aus BALB/c-Mäusen verlieren jedoch nach einer *L. major* Ko-Kultur die Fähigkeit CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu supprimieren. Es zeigte sich auch, dass in BALB/c Suppressionassays signifikant weniger Nitrit nachweisbar war, was auf eine reduzierte iNOS-Aktivität in BALB/c-MDSCs hinweist. Ein weiterer Befund stellte sich bei der Analyse der suppressiven Eigenschaften nach einer Stimulation mit ATRA heraus. Zwar kann dadurch eine Differenzierung der unreifen MDSCs und dadurch die prozentualen Anteile an Mo-

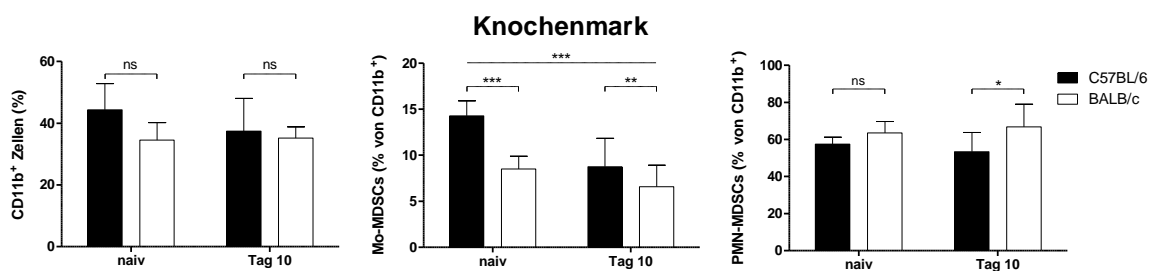
MDSCs und PMN-MDSCs verringert werden. Diese phänotypischen Veränderungen haben aber keinen Einfluss auf die Suppression einer T-Zellproliferation. Abschließend wurde für MDSCs aus C57BL/6-Mäusen gezeigt, dass die Hemmung proliferierender T-Zellen iNOS-abhängig ist.

In weiteren Versuchen wurde nun überprüft, inwiefern sich diese Befunde von *in vitro* MDSCs auf das *in vivo* Modell der Leishmaniose übertragen lassen.

### 3.3 *In vivo* Charakterisierung von MDSCs in der Leishmaniose

#### 3.3.1 Durchflusszytometrische Analyse von Knochenmark, Blut, Milz, poplitealen Lymphknoten und Fussgewebe 10 Tage nach *L. major* Infektion

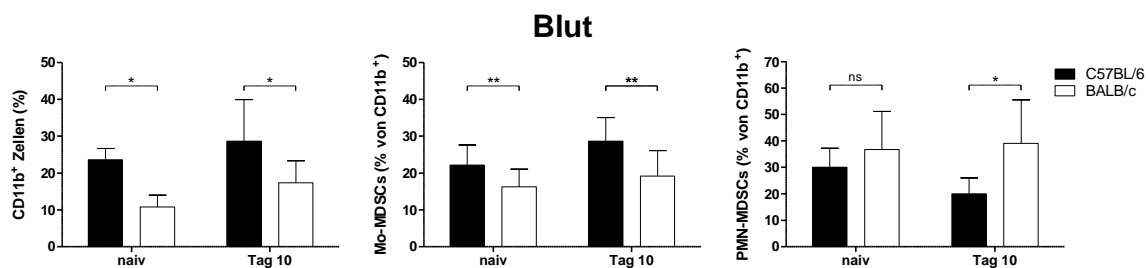
In 3.1 wurde bereits untersucht, wie sich verschiedene Organe hinsichtlich der Zusammensetzung myeloider Zellen in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen unterscheiden. Diese Analyse wurde in Mäusen durchgeführt, deren Immunsystem nicht aktiviert wurde. Im folgenden Abschnitt wurde daher geprüft, wie sich die Zusammensetzung der MDSC-Subtypen während einer Infektion mit *L. major* verändert. In Abb. 3.21 wurde das Knochenmark bezüglich der MDSC-Subtypen analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass 10 Tage nach einer Leishmanieninfektion der Anteil an Mo-MDSCs in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen abnimmt. Gesamt CD11b<sup>+</sup> Zellen zeigen dagegen keine signifikanten Veränderungen während einer *L. major* Infektion. PMN-MDSCs findet man dagegen in BALB/c-Mäusen in erhöhten Anteilen im Knochenmark als in C57BL/6-Mäusen. Diese Daten deuten darauf hin, dass Mo-MDSCs aus dem Knochenmark migrieren, und dass diese



**Abb. 3.21: Zusammensetzung myeloider Zellen im Knochenmark von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion.** Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks aus uninfizierten und 10 Tage infizierten Mäusen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=6). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

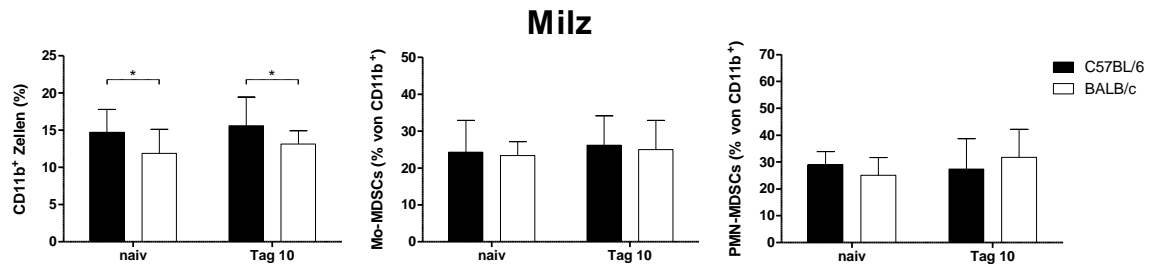
Abnahme in C57BL/6-Mäusen stärker ist als in BALB/c. PMN-MDSCs akkumulieren im Knochenmark von BALB/c-Mäusen, was auf eine verstärkte Neubildung dieser Zellen oder eine fehlerhafte Rekrutierung hindeutet.

Während einer Infektion werden gehäuft myeloide Zellen aus dem Knochenmark über das Blutkreislaufsystem zum Entzündungsherd rekrutiert (Kolaczowska und Kubes 2013; Imhof und Aurrand-Lions 2004; Yona und Jung 2010). Daher wurde auch das Blut auf die Präsenz von MDSCs untersucht. Wie in Abb. 3.22 dargestellt, nimmt der prozentuale Anteil sowohl  $CD11b^+$  Zellen als auch Mo-MDSCs tendentiell zu. Bei der Berechnung der Gesamtzellzahl pro ml Blut, konnte auch ein signifikanter Anstieg von  $CD11b^+$  Zellen und Mo-MDSCs festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). BALB/c-Mäuse zeigen dagegen eine signifikant reduzierte Fähigkeit myeloide Zellen und insbesondere Mo-MDSCs aus dem Knochenmark zu rekrutieren. Allerdings werden im Blut von BALB/c Mäusen signifikant mehr PMN-MDSCs an Tag 10 nach einer *L. major* Infektion detektiert. Diese Ergebnisse deuten auf eine stark abweichende Fähigkeit zur Mobilisierung von myeloiden Zellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf in den beiden Mausstämmen hin.



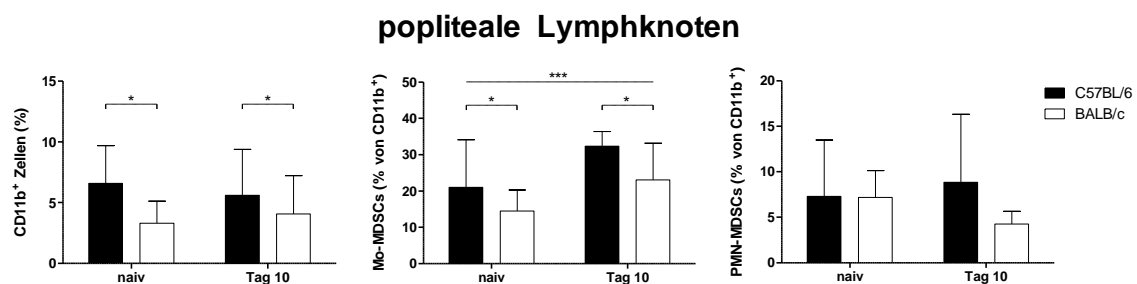
**Abb. 3.22: Zusammensetzung myeloider Zellen im Blut von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion.** Blutzellen aus uninfizierten und 10 Tage infizierten Mäusen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als  $CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^{high}$  Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als  $CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{low}$ . Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=6). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

Ob diese Unterschiede auch in sekundären lymphatischen Organen beobachtet werden können, zeigen Abb. 3.23 und 3.24. In der Milz ist lediglich der prozentuale Anteil an  $CD11b^+$  Zellen sowohl in naiven als auch 10 Tage nach einer Leishmanieninfektion in BALB/c-Mäusen reduziert. Bei den MDSC-Subtypen ist keine Veränderung während des Krankheitsverlaufs festzustellen.



**Abb. 3.23: Zusammensetzung myeloider Zellen in der Milz von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion.** Milzzellen aus uninfizierten und 10 Tage infizierten Mäusen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=8). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

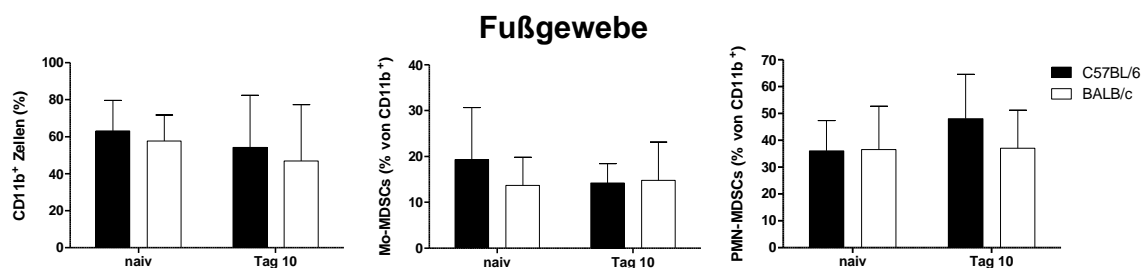
Möglicherweise ist an Tag 10 einer Leishmaniose die systemische Aktivierung des Immunsystems noch nicht in der Milz detektierbar. Deshalb wurde in Abb. 3.24 der drainierende Lymphknoten der infizierten Füße von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen analysiert. Wie bereits in der Milz beobachtet wurde, ist auch in den Lymphknoten der prozentuale Anteil CD11b<sup>+</sup> Zellen in BALB/c-Mäusen signifikant geringer. Im Gegensatz zur Milz kann jedoch ein signifikanter Anstieg an Mo-MDSCs in beiden Mäusen ermittelt werden. Dabei ist in BALB/c-Mäusen der prozentuale Anteil an Mo-MDSCs geringer. Dieser Befund deutet darauf hin, dass monozyten-ähnliche Zellen mit möglichen suppressiven Eigenschaften in Lymphknoten akkumulieren. Es wurde weiterhin untersucht, ob myeloide Zellen am Infektionsort vorhanden sind.



**Abb. 3.24: Zusammensetzung myeloider Zellen in poplitealen Lymphknoten von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion.** Einzelzellsuspensionen der Lymphknoten aus uninfizierten und 10 Tage infizierten Mäusen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=8 für naiv; n=14 für Tag 10). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).



In Abb. 3.25 sind keine Abweichungen der Zusammensetzung von myeloiden Zellen während einer Leishmanieninfektion zwischen C57BL/6- und BALB/c-Mäusen zu erkennen. Bei der Berechnung der gesamten Zellzahl im Fußgewebe, konnte sowohl ein signifikanter Anstieg von  $CD45^+ CD11b^+$  Zellen als auch Mo-MDSCs festgestellt werden, wohingegen PMN-MDSCs keine signifikante Zunahme aufwiesen. Desweiteren werden Mo-MDSCs in C57BL/6 in höherem Maße rekrutiert als in BALB/c-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Es spiegelt sich also der Phänotyp, der sich im Knochenmark, Blut und Lymphknoten abgezeichnet hat, auch am Ort der Infektion wider. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Anhäufung myeloider Zellen im Lymphknoten oder am Infektionsort auf eine Rekrutierung aus dem Knochenmark oder eine Proliferation von myeloiden Zellen im Gewebe zurückzuführen ist.

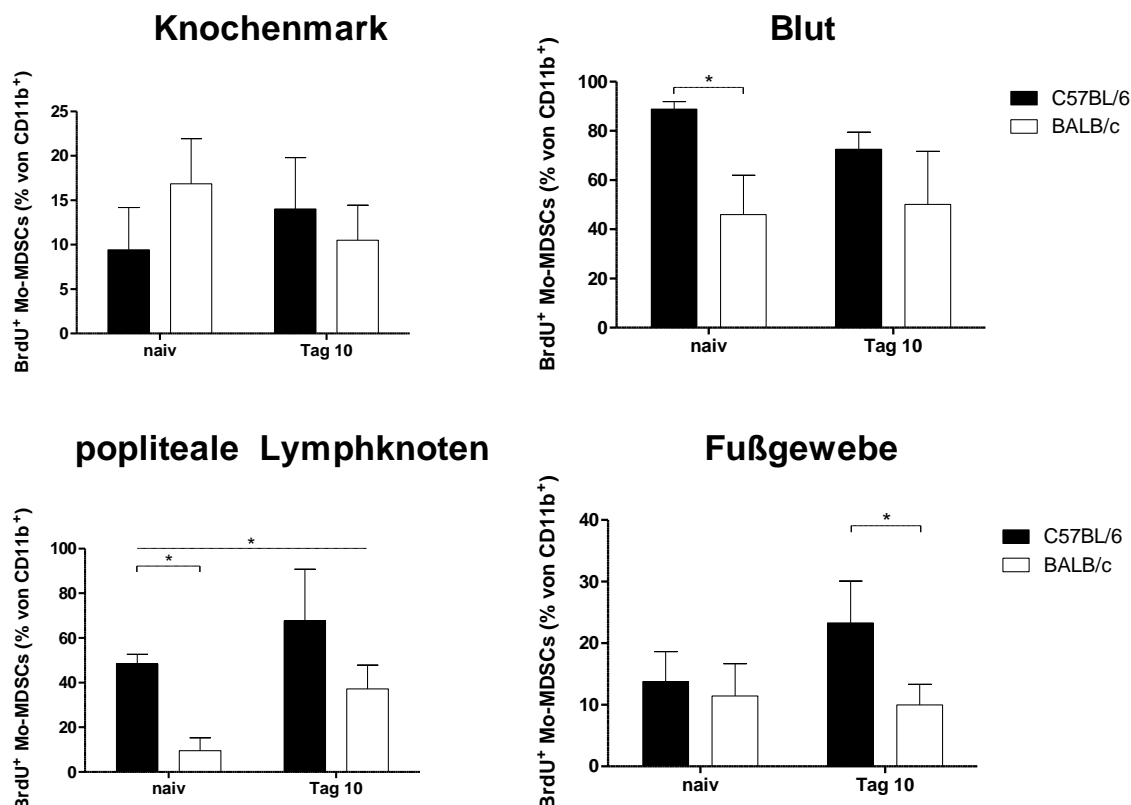


**Abb. 3.25: Zusammensetzung myeloider Zellen im Fußgewebe von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion.** Einzelzellsuspensionen des Fußgewebes aus uninfizierten und 10 Tage infizierten Mäusen wurden mit den Oberflächenmarkern CD45, CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als  $CD45^+ CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^{high}$  Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als  $CD45^+ CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{low}$ . Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=10). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

### 3.3.2 *In vivo* Detektion von proliferierenden myeloiden Zellen während einer *L. major* Infektion

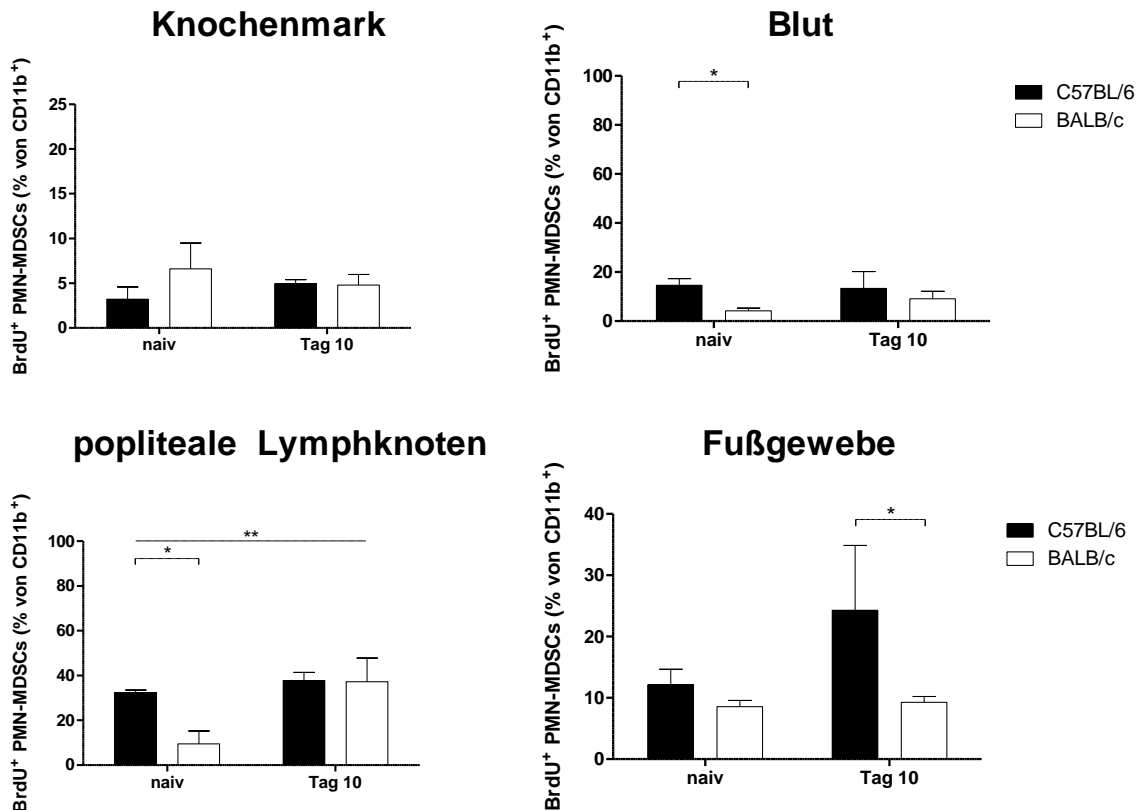
In Abschnitt 2.2.2.3 wurde beschrieben, wie eine Zellproliferation *in vivo* nachgewiesen wird. Dazu ist das Thymidin-Analogon BrdU benutzt worden, dass von proliferierenden Zellen in die DNA eingebaut wird und sich mittels einer spezifischen Antikörper-Färbung detektiert werden kann. Abb. 3.26 zeigt proliferierende Mo-MDSCs an Tag 10 einer *L. major* Infektion in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen. Hervorzuheben ist hier, dass vor allem in Lymphknoten signifikant mehr  $BrdU^+$  Mo-MDSCs an Tag 10 vorzufinden sind. Dabei sind in BALB/c-Mäusen prozentual weniger  $BrdU^+$  Mo-MDSCs vorhanden. Am Infektionsort akkumulieren in C57BL/6-Mäusen  $BrdU^+$  Mo-MDSCs, wohingegen in BALB/c-Mäusen keine Anhäufung von  $BrdU^+$  Mo-MDSCs nachzuweisen ist. Es ist anzunehmen, dass proliferierende Mo-

MDSCs im Knochenmark BrdU eingebaut haben und anschließend zum Infektionsort rekrutiert wurden.



**Abb. 3.26: Proliferierende Mo-MDSCs im Knochenmark, Blut, Lymphknoten und Fußgewebe von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion.** C57BL/6- und BALB/c-Mäusen wurde an Tag 7 der *L. major* Infektion BrdU (0,8 mg/ml) im Trinkwasser verabreicht. Nach weiteren 3 Tagen wurden die verschiedenen Organe für eine durchflusszytometrische Färbung aufgearbeitet. Proliferierende Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> BrdU<sup>+</sup> Zellen charakterisiert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

Abb. 3.27 zeigt die Analyse von proliferierenden PMN-MDSCs in den verschiedenen Organen. Auffällig ist die verringerte Anzahl BrdU<sup>+</sup> PMN-MDSCs in allen untersuchten Organen im Vergleich zu Mo-MDSCs. Dieser Befund weist darauf hin, dass PMN-MDSCs eine geringere Fähigkeit zur Proliferation aufweisen als Mo-MDSCs. Im Lymphknoten sieht man den gleichen Befund wie bei Mo-MDSCs: an Tag 10 der *L. major* Infektion ist auch der prozentuale Anteil von BrdU<sup>+</sup> PMN-MDSCs signifikant erhöht. Wie auch bei Mo-MDSCs, hat sich die Anzahl BrdU<sup>+</sup> PMN-MDSCs im Fußgewebe nur in C57BL/6 Mäusen erhöht.



**Abb. 3.27: Proliferierende PMN-MDSCs im Knochenmark, Blut, Lymphknoten und Fußgewebe von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion.** C57BL/6- und BALB/c-Mäusen wurde an Tag 7 der *L. major* Infektion BrdU (0,8 mg/ml) im Trinkwasser verabreicht. Nach weiteren 3 Tagen wurden die verschiedenen Organe für eine durchflusszytometrische Färbung aufgearbeitet. Proliferierende PMN-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup> BrdU<sup>+</sup> Zellen charakterisiert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

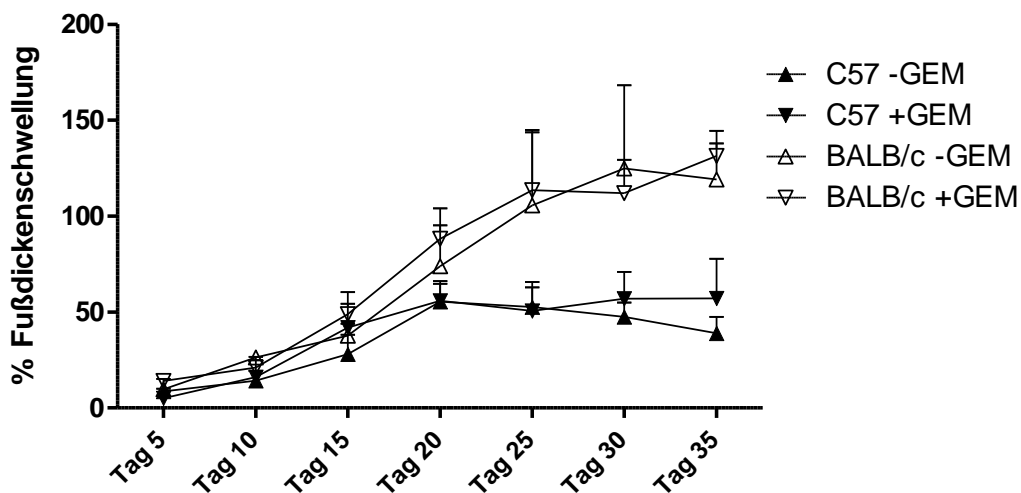
Fasst man die beobachteten Befunde zusammen, so kann gefolgert werden, dass PMN-MDSCs eine deutlich reduzierte Fähigkeit zur Proliferation während einer Leishmaniose aufweisen als Mo-MDSCs. Im Lymphknoten sieht man sowohl einen Anstieg BrdU<sup>+</sup> Mo-MDSCs und PMN-MDSCs, die vermutlich nach der Rekrutierung zum Infektionsort in den Lymphknoten wandern oder dort proliferieren. Daher ist nicht auszuschließen, dass eine partielle Depletion myeloider Zellen (einschließlich Mo- und PMN-MDSCs) einen positiven oder negativen Effekt auf den Verlauf der Leishmanieninfektion hat.

### 3.3.3 Depletion myeloider Zellen mit Gemcitabin während einer *L. major* Infektion

In einer Chemotherapie von Krebspatienten wird häufig das Zytostatikum Gemcitabin verwendet. Eine unerwünschte Nebenwirkung dieses Medikaments ist die Schädigung von Knochenmarkszellen (Le et al. 2009). Die damit einhergehende Depletion der myeloiden

Zellen wurde ausgenutzt, um zu untersuchen, wie sich der Verlauf einer Leishmaniose im Mausmodell verändert, wenn eine reduzierte Anzahl an Mo-MDSCs oder PMN-MDSCs während der Immunantwort vorhanden sind. Dazu wurden Mäuse während einer *L. major* Infektion alle 5 Tage mit Gemcitabin i.p. behandelt.

#### Gemcitabin Behandlung während einer *L. major* Infektion



**Abb. 3.28: Gemcitabin Behandlung während einer *L. major* Infektion in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen.** C57BL/6- und BALB/c-Mäusen wurde alle 5 Tage nach einer *L. major* Infektion i.p. 1,2 mg / Maus Gemcitabin verabreicht. Die Fußschwellung wurde auf den nicht infizierten Fuß relativiert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=4).

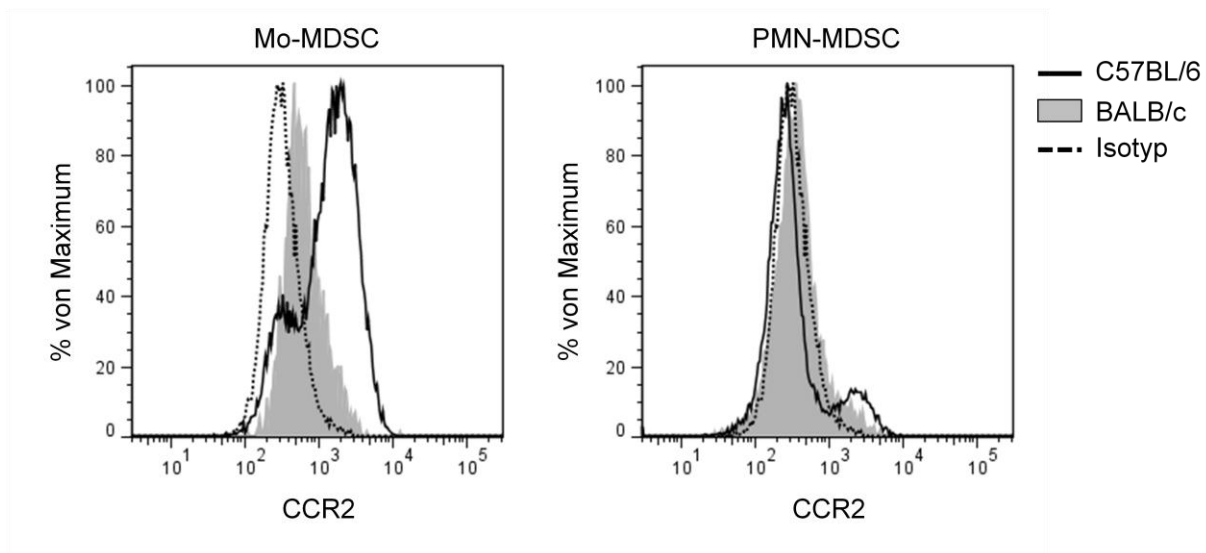
In Abb. 3.28 ist der Verlauf der Fußdicke während der Leishmanieninfektion abgebildet. Weder C57BL/6- noch BALB/c-Mäuse zeigten eine Veränderung der Schwellung während der ersten 30 Tage der *L. major* Infektion. Lediglich an Tag 35 zeichnet sich ein Unterschied bei C57BL/6-Mäusen ab. Der Versuch wurde aus tierschutzrechtlichen Gründen an Tag 35 beendet, da sich bei BALB/c-Mäusen gravierende Läsionen gebildet hatten. Zumindest während der Entwicklung einer adaptiven Immunantwort, scheint eine Behandlung mit Gemcitabin in einem 5-tägigen Rhythmus, keinen Einfluss auf den Verlauf der Leishmaniose zu haben. Auch bei der durchflusszytometrischen Analyse des Blutes an Tag 30, konnten keine signifikanten Veränderungen in der Zusammensetzung myeloider Zellen durch Gemcitabin-Behandlung während einer Infektion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dabei ist zu erwähnen, dass nach 5 Tagen die depletierten myeloiden Zellen wieder in der Zirkulation vorzufinden sind (Suzuki et al. 2005). Dies könnte eine mögliche Erklärung für den Befund an Tag 30 im Blut sein.

Da durch eine chemotherapeutische Behandlung der infizierten Tiere keine Veränderungen der myeloiden Zellen erzielt wurden, stellte sich die Frage, ob eine genetische Deletion des C-C Chemokin-Rezeptors CCR2 in C57BL/6 Mäusen eine Veränderung des Krankheitsverlaufs beobachtet werden kann.

### 3.4 Die Bedeutung von CCR2 für das ‚homing‘ von MDSCs

#### 3.4.1 Die Expression von CCR2 auf der Zelloberfläche von MDSCs

Der C-C Chemokin-Rezeptor 2 (CCR2) wird auf der Oberfläche von Monozyten und T-Zellen exprimiert (Mack et al. 2001) und ist für die Rekrutierung dieser Zellen zu Entzündungsreaktionen verantwortlich. Wie in den Publikationen (Umemura et al. 2008; Lesokhin et al. 2012) beschrieben wurde, exprimieren auch MDSCs in Tumormodellen CCR2. Daher wurde geprüft, ob *in vitro* generierte MDSCs ebenfalls CCR2 exprimieren.



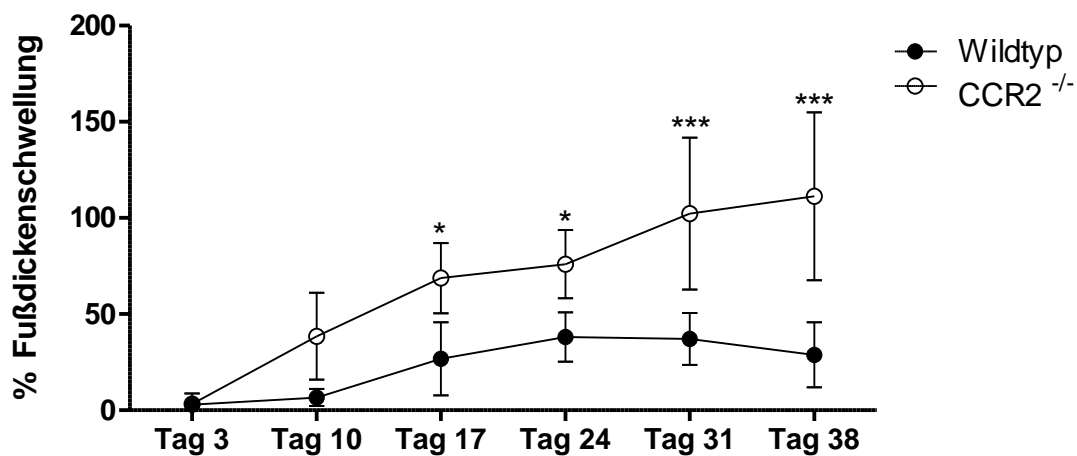
**Abb. 3.29: Durchflusszytometrische Analyse der CCR2-Expression von *in vitro* generierten MDSCs.** Die Einzellsuspensionen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert, PMN-MDSCs als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>low</sup>. Von diesen Populationen wurde die CCR2-Expression in einem Histogramm abgebildet (n=2; ein Experiment gezeigt). C57BL/6 MDSCs = schwarze Linie; BALB/c MDSCs = grau gefüllt; Isotyp-Kontrolle = schwarz gestrichelt.

Abbildung 3.29 zeigt die CCR2-Expression von *in vitro* MDSCs. Wie sich gezeigt hat, wird CCR2 nur von C57BL/6-Mo-MDSCs auf der Oberfläche exprimiert, bei BALB/c-Mo-MDSCs ist dagegen keine CCR2-Expression zu erkennen. PMN-MDSCs präsentieren weder in C57BL/6- noch in BALB/c-Kulturen CCR2 auf ihrer Oberfläche. Aufgrund dieses Befundes konnte eine Untersuchung von CCR2-defizienten Mäusen (CCR2<sup>-/-</sup> oder CCR2 k.o.) durchgeführt werden, da hier selektiv nur die CCR2-exprimierenden Mo-MDSCs betroffen

sind und in ihrem Migrationsverhalten beeinflusst werden. PMN-MDSCs sollten bei einer CCR2-Defizienz ihr Migrationsverhalten beibehalten, da sie ihn nicht auf ihrer Zelloberfläche präsentieren.

### 3.4.2 Der Verlauf einer Leishmaniose in CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen

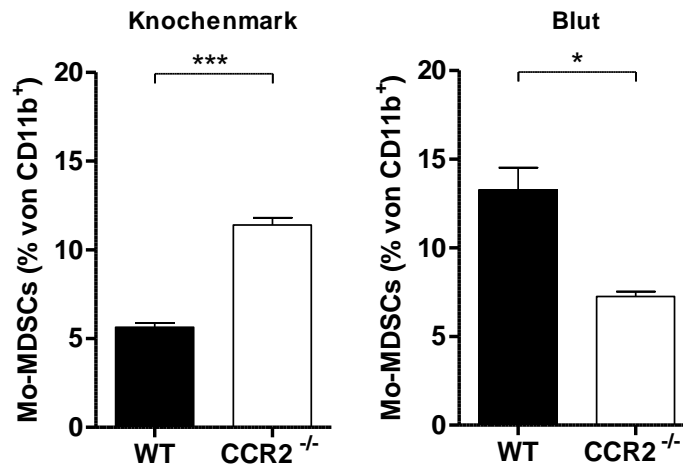
Da nur Mo-MDSCs CCR2 exprimieren, wurden CCR2<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet, um zu klären, ob eine fehlende Rekrutierung von Mo-MDSCs zum Infektionsort eine Veränderung des Krankheitsverlaufs während einer Leishmaniose bewirkt. Dafür wurden zunächst CCR2<sup>-/-</sup> Mäuse mit *L. major* Parasiten infiziert und die Fußdicke wöchentlich ermittelt.



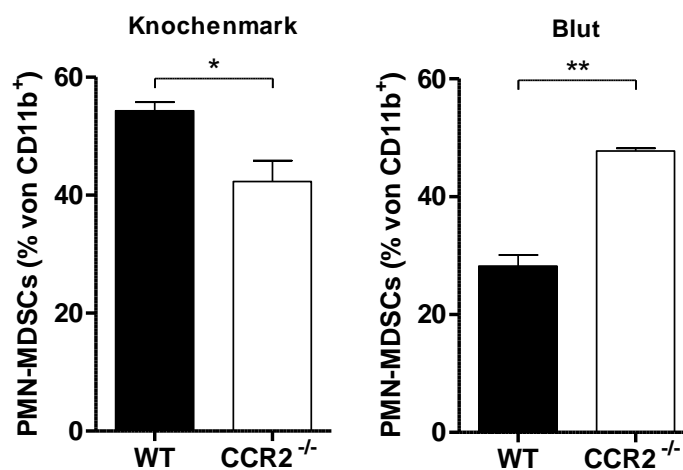
**Abb. 3.30: Verlauf der *L. major* Infektion in C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** C57BL/6- (schwarze Kreise) und CCR2<sup>-/-</sup>- (weiße Kreise) Mäuse wurde mit  $3 \times 10^6$  *L. major* Parasiten subkutan in die Hinterpfote infiziert. Die Fußschwellung wurde auf den nicht infizierten Fuß relativiert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=3 für Tag 3 und Tag 10; n=6 für Tag 17-38). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

Wie bereits in den Publikationen (Quinones et al. 2007; Sato et al. 2000) gezeigt wurde, stellte sich heraus, dass während einer Infektion mit *L. major* die Fußdicke in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht war. Ob dieser drastische Verlauf der Fußdickenschwellung aufgrund einer deregulierten Immunreaktion in Abwesenheit von MDSCs und mit einer gestörten Rekrutierung von Mo-MDSCs aus dem Knochenmark korreliert, wurde an Tag 38 das Knochenmark und Blut der Mäuse auf das Vorhandensein von MDSCs gefärbt. In Abb. 3.31 sind die Ergebnisse zu Mo-MDSCs dargestellt und 3.32 die von PMN-MDSCs. Es ist deutlich zu erkennen, dass CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen eine reduzierte Rekrutierung von Mo-MDSCs in das Blutkreislaufsystem aufweisen. Dagegen sind PMN-MDSCs nicht davon betroffen und zeigen eine entgegengesetzte

Tendenz: einen verringerten prozentualen Anteil im Knochenmark, dafür einen erhöhten Anteil im Blut. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei  $CCR2^{-/-}$  Mäusen die Mobilisierung von myeloiden Zellen aus dem Knochenmark stark abweichend vom Wildtyp ist.

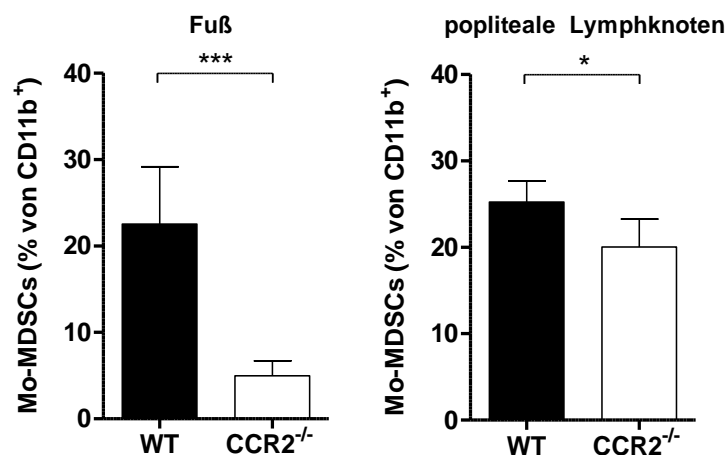


**Abb. 3.31: Durchflusszytometrische Analyse von Mo-MDSCs im Knochenmark und Blut von C57BL/6- und  $CCR2^{-/-}$ -Mäusen an Tag 38 einer *L. major* Infektion.** Die Einzelzellsuspensionen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als  $CD11b^{+}$   $Ly6G^{-}$   $Ly6C^{high}$  Zellen charakterisiert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem *unpaired student's t-test*.

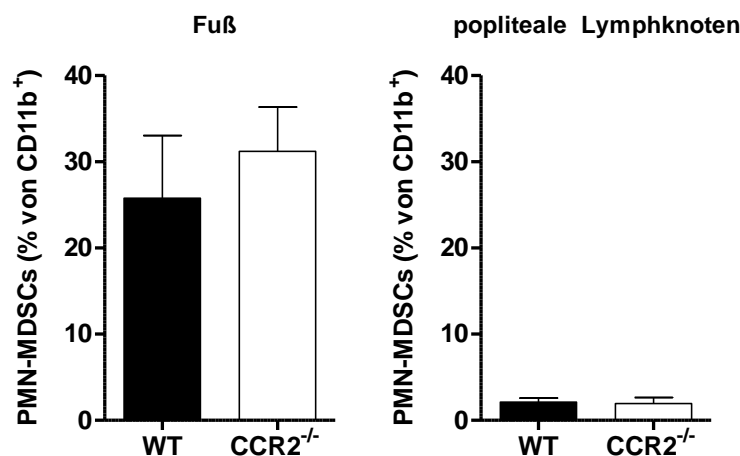


**Abb. 3.32: Durchflusszytometrische Analyse von PMN-MDSCs im Knochenmark und Blut von C57BL/6- und  $CCR2^{-/-}$ -Mäusen an Tag 38 einer *L. major* Infektion.** Die Einzelzellsuspensionen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. PMN-MDSCs wurden als  $CD11b^{+}$   $Ly6G^{+}$   $Ly6C^{low}$  charakterisiert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem *unpaired student's t-test*.

Inwiefern diese reduzierte Rekrutierung von Mo-MDSCs in den Blutkreislauf auf die systemische Verfügbarkeit hat, wurde die Präsenz von MDSCs im infizierten Fußgewebe und drainierenden Lymphknoten untersucht. An Tag 10 während einer *L. major* Infektion wurde festgestellt, dass Mo-MDSCs in ihrer Fähigkeit zum Entzündungsort zu migrieren, stark eingeschränkt sind (Abb. 3.33). Weiterhin ist der prozentuale Anteil dieses Zellsubtyps im drainierenden Lymphknoten geringer. Im Gegensatz dazu ist das Migrationsverhalten von PMN-MDSCs CCR2-unabhängig, da diese Zellen diesen Rezeptor nicht exprimieren (siehe Abb. 3.33 und 3.29).



**Abb. 3.33:** Durchflusszytometrische Analyse von Mo-MDSCs im Fußgewebe und poplitealen Lymphknoten von C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 10 einer *L. major* Infektion. Die Einzelzellsuspensionen wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. Mo-MDSCs wurden als CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup> Zellen charakterisiert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=5). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem *unpaired student's t-test*.



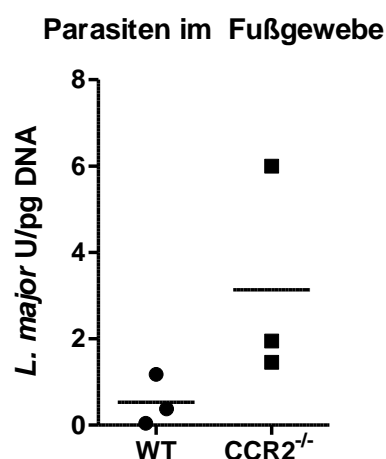
**Abb. 3.34:** Durchflusszytometrische Analyse von PMN-MDSCs im Fußgewebe und poplitealen Lymphknoten von C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 10 einer *L. major* Infektion. Die Einzelzellsuspensionen



wurden mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C und Ly6G gefärbt. PMN-MDSCs wurden als  $CD11b^+ Ly6G^+ Ly6C^{low}$  charakterisiert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=5). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem *unpaired student's t-test*.

Nun kann diese geringere Anzahl an Mo-MDSCs im Fußgewebe und die erhöhte Fußdicke mehrere Effekte zur Folge haben i) es fehlen Wirtszellen für die intrazellulären Parasiten ii) die Immunantwort am Entzündungsort ist dereguliert (da eine Suppression fehlt) oder iii) es fehlt eine Aktivierung des Immunsystems (durch Makrophagen und dendritische Zellen die aus Mo-MDSCs differenzieren können).

Um zu prüfen, ob die reduzierte Anzahl an Wirtszellen auch in einer reduzierten Anzahl an Parasiten resultiert, wurde die Anzahl der Parasiten im infizierten Fuß mittels qRT-PCR bestimmt. In Abb. 3.34 ist zu erkennen, dass Mäuse die kein CCR2 exprimieren eine erhöhte Anzahl an *L. major* Parasiten am Infektionsort aufweisen. Die geringere Anzahl an Mo-MDSCs hat also keine Verringerung der Parasitenzahl im Fuß zur Folge. Dieser Befund gibt einen Hinweis darauf, dass das Fehlen von Mo-MDSCs eine ineffektive Eliminierung der Leishmanien mit sich bringt und kann daher nicht auf eine fehlende Immunsuppression durch die Abwesenheit von Mo-MDSCs zurückgeführt werden. Mit diesem Ergebnis lässt sich die massive Fussdickenschwellung bereits teilweise erklären. Jedoch bleibt die Ursache für die erhöhte Parasitenzahl im Fußgewebe noch zu klären. Eine mögliche Erklärung wäre die ineffektive Bekämpfung durch das Fehlen der  $CCR2^+$  monozytären Zellen am Entzündungsort.

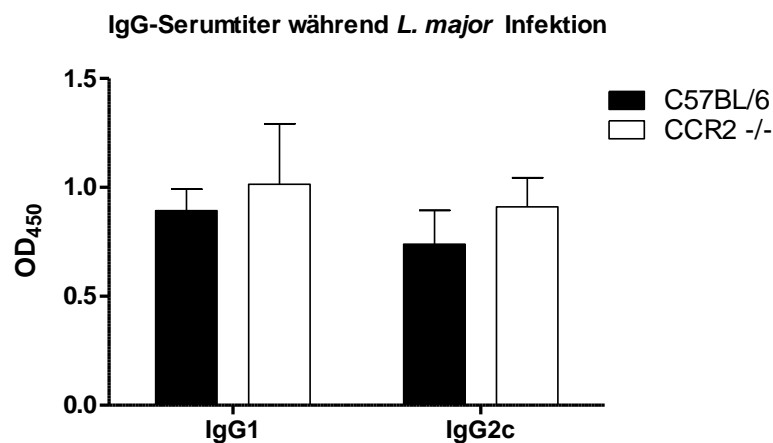


**Abb. 3.35: Bestimmung der Parasiten-Last im Fußgewebe von C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 38.** Aus dem Fußgewebe wurde wie in 2.2.3.1 beschrieben die genomische DNA isoliert. Die Anzahl der Leishmanien wurde mit der Ermittlung der 18S rRNA

bestimmt (siehe 2.2.3.5). Abgebildet ist die Anzahl von Leishmanien pro pg DNA. Es sind die Mittelwerte dargestellt (n=3).

Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurde der Titer Leishmanien-spezifischer IgGs von infizierten C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels ELISA bestimmt. Wie sich herausstellte, waren die IgG1- und IgG2c-Werte in C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen vergleichbar (Abb. 3.35). Dieses Resultat spricht gegen eine generelle Hemmung des Immunsystems durch Mo-MDSCs während einer Leishmaniose. Die dadurch resultierende Immunantwort bewirkt allerdings keine effektive Beseitigung der Parasiten.

Um zu klären, ob die reduzierte Fähigkeit zur Bekämpfung der Leishmanien in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen durch das Fehlen monozytärer Zellen am Entzündungsort verursacht wird, wurden sogenannte Knochenmark-Chimäre Mäuse generiert.

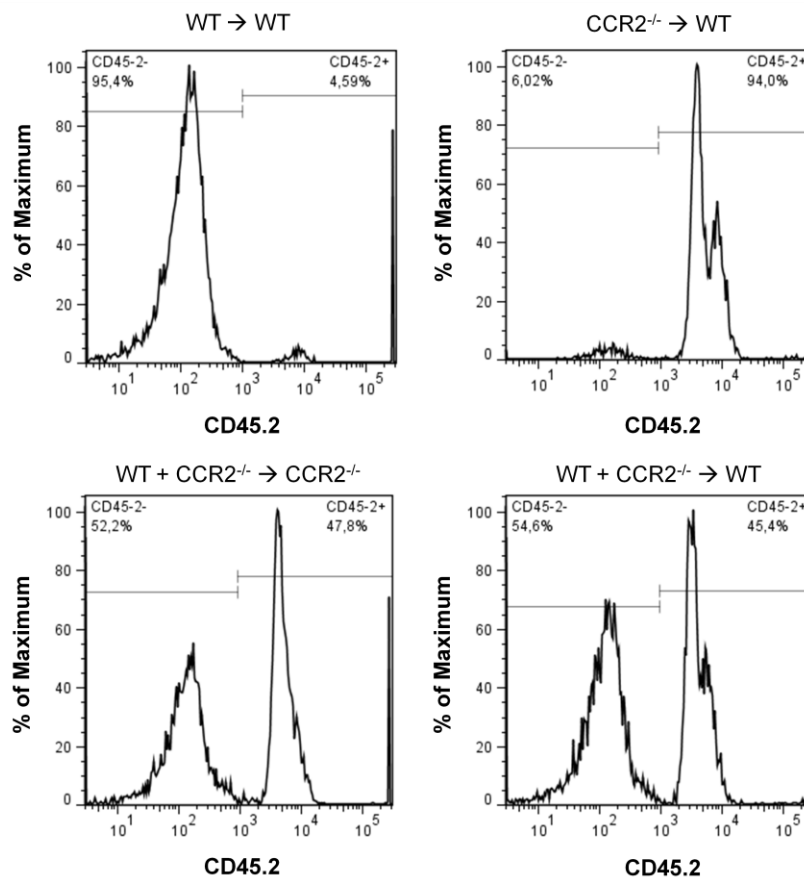


**Abb. 3.36: Leishmanien-spezifischer IgG-Titer im Serum von infizierten C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen.** C57BL/6 und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden geblutet und nach 4 Stunden das Serum gewonnen. Zur Bestimmung Leishmanien-spezifischer Immunglobuline wurden ELISA-Platten mit Leishmanien gecoatet (siehe 2.2.1.14) und mit dem Serum inkubiert. Für den Nachweis von Immunglobulinen wurden HRP-konjugierte Detektionsantikörper verwendet (anti-IgG1 und anti-IgG2c). Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

### 3.4.3 Untersuchung von Knochenmark-Chimären während einer Leishmanieninfektion (CCR2<sup>-/-</sup> ↔ WT)

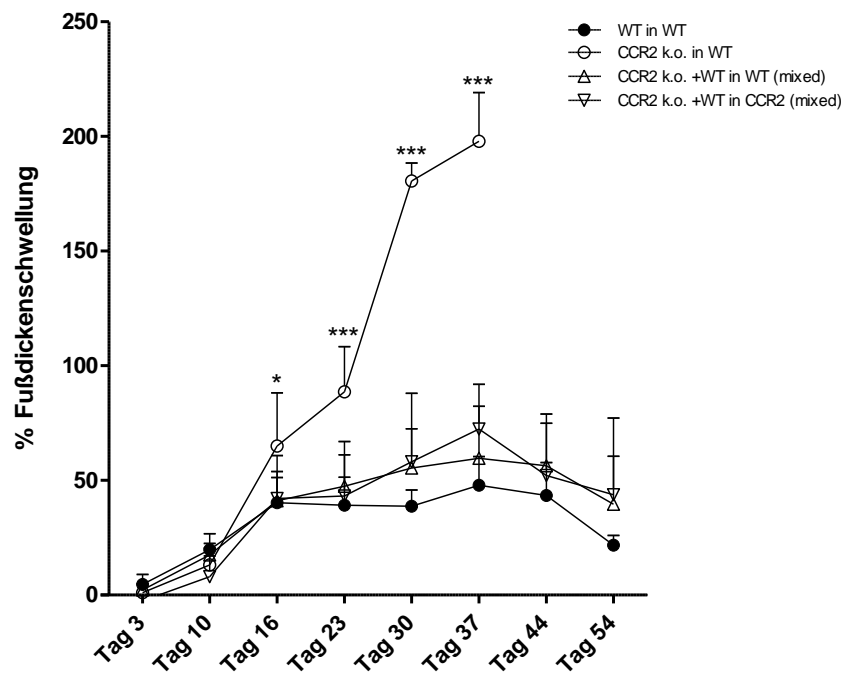
Für den Nachweis, dass für den massiven Krankheitsverlauf in CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen das Fehlen von CCR2<sup>+</sup> monozytären Zellen am Entzündungsort verantwortlich ist, wurden Knochenmark-Chimäre Mäuse generiert. Es wurden wie in 2.2.2.4 beschrieben C57BL/6-Mäuse nach einer Bestrahlung mit 6 Gray (2x), mit verschiedenen Knochenmark-

Kombinationen rekonstituiert. Als Negativ-Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse, die nur Wildtyp-Knochenmark bekommen haben (WT  $\rightarrow$  WT), um einen Effekt der Bestrahlung auf den Verlauf der Leishmaniose auszuschließen. Für den Nachweis, dass der Phänotyp der CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse auch nach einem Knochenmark-Transfer vorhanden ist, wurde in C57BL/6-Mäuse CCR2<sup>-/-</sup>-Knochenmark injiziert (CCR2<sup>-/-</sup>  $\rightarrow$  WT). Desweiteren wurden sogenannte Knochenmark-Chimäre Mäuse generiert. Diese Mäuse erhielten eine 1:1 Mischung aus Wildtyp- und CCR2<sup>-/-</sup>-Knochenmark. Dabei wurden 2 Gruppen gebildet in denen die Empfänger entweder Wildtyp-Mäuse (CCR2<sup>-/-</sup> + WT  $\rightarrow$  WT) oder CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse (CCR2<sup>-/-</sup> + WT  $\rightarrow$  CCR2<sup>-/-</sup>) waren. Diese Knochenmark-Chimäre besitzen zwei Vorteile gegenüber den reinen CCR2-defizienten Tieren: zum einen kann in chimären Mäusen ein Effekt von nicht-hämatopoetischen Zellen ausgeschlossen werden und zum anderen kann das Migrationsverhalten von monozytären Zellen aus Wildtyp- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen im selben Organismus verglichen werden. Für den Nachweis, dass der Knochenmark-Transfer funktioniert hat, wurde an Tag 30 nach dem Transfer das Blut untersucht. In Abb. 3.36 wurde durchflusszytometrisch bestimmt wieviel CD11b<sup>+</sup> Zellen im Blut auch positiv für CD45.2 sind. Beim Transfer von WT (CD45.1)  $\rightarrow$  WT (CD45.2) konnte eine ~95%-ige Rekonstitution erreicht werden. Wildtyp Mäuse (CD45.1) die das Knochenmark von CCR2<sup>-/-</sup> (CD45.2) bekommen haben, zeigten ebenfalls eine fast vollständige Ersetzung des hämatopoetischen Systems durch das Spender-Knochenmark. Mäuse mit chimärem Knochenmark, zeigten eine etwa 45%-ige Rekonstitution. Somit war der Knochenmark-Transfer erfolgreich.



**Abb. 3.37: Rekonstitution im Blut von Knochenmark-Chimären Mäusen.** Das Blut von (WT → WT, links oben), (CCR2<sup>-/-</sup> → WT, rechts oben), (CCR2<sup>-/-</sup> + WT → CCR2<sup>-/-</sup>, links unten) und (CCR2<sup>-/-</sup> + WT → WT, rechts unten) wurde 30 Tage nach dem Knochenmark-Transfer mit CD11b und CD45.2 für die Durchflusszytometrie gefärbt. Die Histogramme zeigen wieviel CD11b<sup>+</sup> Zellen CD45.2 exprimieren.

Um zu testen, wie sich der Krankheitsverlauf der Leishmaniose in den rekonstituierten Mäusen entwickelt, wurden die Knochenmark-Chimäre 6 Wochen nach dem Transfer mit *L. major* Parasiten infiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.37 dargestellt. Wildtyp-Mäuse denen nur CCR2<sup>-/-</sup>-Knochenmark übertragen wurde, entwickelten eine starke Fußdickenschwellung. Eine 50%-ige Ersetzung des defizienten Knochenmarks mit Wildtyp-Zellen, konnte den enormen Phänotyp in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen bereits aufheben.

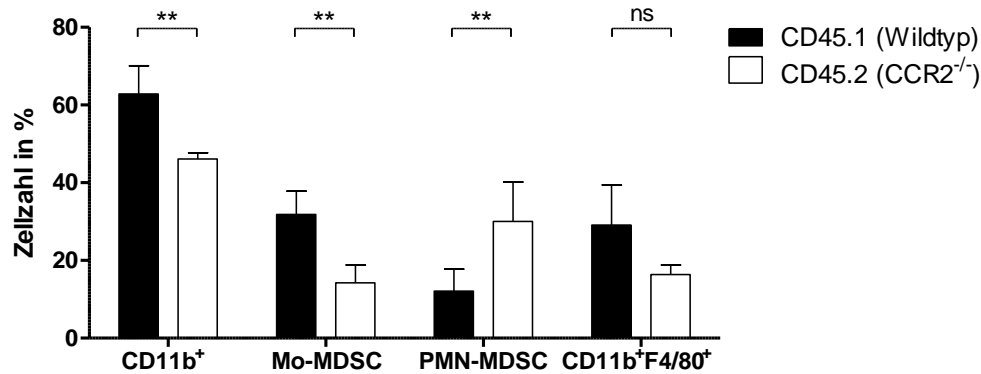
Fußdicke in Knochenmark-Chimären während einer *L. major* Infektion

**Abb. 3.38: Verlauf einer *L. major* Infektion in Knochenmark-Chimären.** (WT → WT), (CCR2<sup>-/-</sup> → WT), (CCR2<sup>-/-</sup> +WT → WT) und (CCR2<sup>-/-</sup> +WT → CCR2<sup>-/-</sup>; siehe Text) wurden 6 Wochen nach dem Knochenmark-Transfer mit  $3 \times 10^6$  *L. major* Parasiten subkutan in die Hinterpfote infiziert. Die Fußschwellung wurde auf den nicht-infizierten Fuß relativiert. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=3 für WT → WT an Tag 3, 10, 37-54; n=6 für Tag 16-30; n=3 für CCR2<sup>-/-</sup> → WT an Tag 3, 10, 37-54; n=6 für Tag 16-30; n=6 für beide Chimären-Gruppen an Tag 3, 10, 37-54; n=12 für Tag 16-30). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

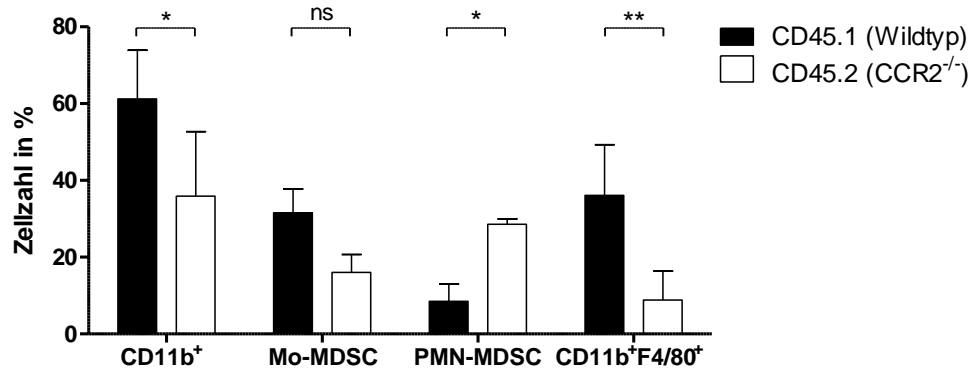
Zum Vergleich des Migrationsverhaltens von Wildtyp und CCR2-defizienten Zellen während der Infektion, wurde eine FACS-Analyse des Fußgewebes und der Lymphknoten durchgeführt. An Tag 21 wurde das Fußgewebe mit Antikörpern gegen CD45.1 (Wildtyp) und CD45.2 (CCR2<sup>-/-</sup>) gefärbt, um zu unterscheiden, ob die Zellen aus einer Wildtyp- oder knock-out-Maus stammen. Weiterhin wurden, wie in den vorangegangenen Färbungen, myeloide Zellsubtypen gefärbt. In Abb. 3.38 ist zu erkennen, dass Zellen die fähig sind CCR2 zu exprimieren in höherem Maße am Infektionsort akkumulieren als CCR2-defiziente Zellen. Sowohl alle CD11b<sup>+</sup> Zellen als auch Mo-MDSCs migrieren demnach CCR2-abhängig zur Leishmanien-Infektion. PMN-MDSCs hingegen sind von der CCR2-abhängigen Rekrutierung nicht betroffen. Zusätzlich wurde untersucht, ob Zellen aus Wildtyp- oder CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse Defizite in ihrer Fähigkeit zu Differenzierung haben. Dazu wurde der Oberflächenmarker F4/80 eingesetzt, der für die Identifikation von reifen Makrophagen verwendet wird (Lin et al.

2010). Es stellte sich heraus, dass Zellen die keinen CCR2-Rezeptor tragen, eine verminderte Fähigkeit zur Makrophagen-Differenzierung zeigen. Dieser Befund würde für eine erhöhte Präsenz von myeloiden Suppressor-Zellen am Infektionsort in CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen sprechen.

#### Knochenmark-Transfer (CCR2<sup>-/-</sup> + WT) in Wildtyp-Mäuse



#### Knochenmark-Transfer (CCR2<sup>-/-</sup> + WT) in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse

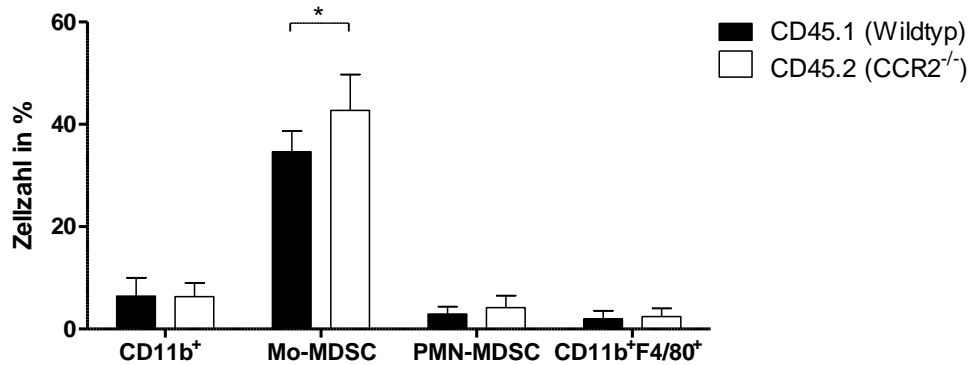


**Abb. 3.39: Durchflusszytometrische Analyse des Fußgewebes aus (WT + CCR2<sup>-/-</sup> → WT; oben)- und (WT + CCR2<sup>-/-</sup> → CCR2<sup>-/-</sup>; unten)-Mäusen während einer *L. major* Infektion.** Wildtyp (=CD45.1; schwarze Balken) und CCR2<sup>-/-</sup> (=CD45.2; weiße Balken) Zellen wurden an Tag 21 einer *L. major* Infektion mit CD11b, Ly6C, Ly6G und F4/80 gefärbt. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=4). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

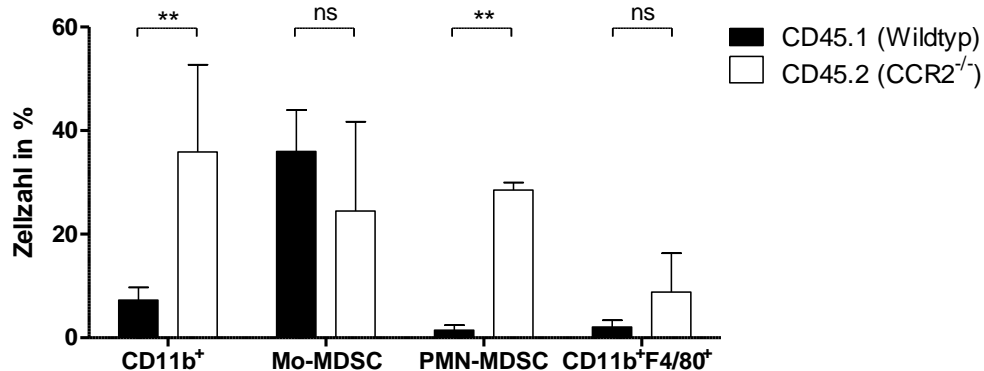
Weiterhin wurde untersucht, ob die in 3.38 gezeigten Ergebnisse auch auf Lymphknoten übertragbar sind, da hier hauptsächlich eine T-Zellproliferation stattfindet und dadurch eine Immunantwort gehemmt werden könnte. In Abb. 3.39 (oben) ist zu sehen, dass Mo-MDSCs im drainierenden Lymphknoten akkumulieren. Dabei ist die Migration CCR2-unabhängig, da auch CD45.2<sup>+</sup> Zellen (CCR2<sup>-/-</sup> Zellen) im Lymphknoten vorzufinden sind. Dieser Befund deutet auf eine unterschiedliche Rekrutierung von Mo-MDSCs in lymphatische Gewebe und Infektionsstellen hin. Wie sich auch in vorangegangenen Experimenten gezeigt hat, ist die

Rekrutierung von PMN-MDSCs CCR2-unabhängig, da der Rezeptor von diesem Zelltyp nicht exprimiert wird (Abb. 3.39 unten).

#### Knochenmark-Transfer (CCR2<sup>-/-</sup> + WT) in Wildtyp-Mäuse



#### Knochenmark-Transfer (CCR2<sup>-/-</sup> + WT) in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse



**Abb. 3.40: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphknoten aus (WT + CCR2<sup>-/-</sup> → WT; oben)- und (WT + CCR2<sup>-/-</sup> → CCR2<sup>-/-</sup>; unten)-Mäusen während einer *L. major* Infektion.** Wildtyp (=CD45.1; schwarze Balken) und CCR2<sup>-/-</sup> (=CD45.2; weiße Balken) Zellen wurden an Tag 21 einer *L. major* Infektion mit CD11b, Ly6C, Ly6G und F4/80 gefärbt. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichung abgebildet (n=4). Die statistische Auswertung erfolgte mit einem 2wayANOVA (mit Bonferroni Post-Test).

Fasst man die Daten aus Abb. 3.38 und 3.39 zusammen, so stellt man fest, dass die Migration von Mo-MDSCs in das Fußgewebe CCR2-abhängig erfolgt, in den Lymphknoten werden Mo-MDSCs aber über einen anderen Mechanismus rekrutiert. Folglich kann nur die reduzierte Anzahl der Mo-MDSCs am Infektionsort für eine Erklärung der enormen Fußdicke und der erhöhten Parasitenzahl herangezogen werden, da im Lymphknoten Mo-MDSCs sowohl in Wildtyp- als auch in CCR2<sup>-/-</sup>-Tieren in vergleichbaren Anteilen zu finden sind.

## 4. Diskussion

Die erfolgreiche Eliminierung des intrazellulären Parasiten *L. major* ist von der Qualität der Immunreaktion abhängig. Werden Zytokine produziert, die überwiegend in T<sub>H</sub>1-dominierten Immunreaktionen vorzufinden sind (z.B. IFN $\gamma$ , IL-12 und wenig IL-4), ist es dem infizierten Organismus möglich die Infektion abzuheilen. Bei einer T<sub>H</sub>2-Immunreaktion (IL-4, IL-13 und wenig IFN $\gamma$ ) entwickelt sich dagegen eine chronische Leishmanieninfektion, da keine Aktivierung der infizierten Makrophagen durch IFN $\gamma$  stattfindet, um die Parasiten abzutöten (Reiner und Locksley 1995). Im Mausmodell werden diese unterschiedlichen Immunreaktionen in zwei Mausstämmen beobachtet: C57BL/6-Mäuse sind in der Lage eine *L. major* Infektion abzuheilen, wohingegen es BALB/c-Mäusen nicht möglich ist die Infektion zu kontrollieren (Sacks und Noben-Trauth 2002). Neben der Beschaffenheit der adaptiven Immunantwort der T-Zellen spielen auch myeloide Zellen eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung der Parasiten. Makrophagen dienen in erster Linie als Wirtszellen in denen die Parasiten replizieren können. Makrophagen agieren aber auch als Effektorzellen des Immunsystems, indem sie ROS (über NADPH-Oxidasen) und leishmanizide NO-Derivate (über iNOS) bilden, die die Parasitenvermehrung einschränken (van Assche et al. 2011). Ebenso sind dendritische Zellen für die erfolgreiche Etablierung einer adaptiven Immunantwort gegen *L. major* von großer Bedeutung (Brewig et al. 2009; Jirillo E. und Brandonisio O. 2010). Weiterhin ist bekannt, dass Makrophagen und dendritische Zellen von einer myeloiden Vorläuferzelle abstammen und zur Infektionsstelle durch inflammatorische Mediatoren rekrutiert werden (Cumano und Godin 2007). Myeloide Zellen sind aber nicht nur in der Lage eine Immunantwort zu unterstützen. Seit mehreren Jahren wird beschrieben, dass unreife myeloide Zellen (MDSCs) eine Immunreaktion auch supprimieren können (Young et al. 1987; Gabrilovich et al. 2012; van Ginderachter et al. 2010). Um einer Immunreaktion des Organismus zu entgehen haben Leishmanien verschiedene Mechanismen entwickelt. So können sie beispielsweise durch das Molekül LPG die Produktion von  $\cdot$ NO-Radikalen verringern oder durch die Expression von Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche eine Apoptose simulieren, um bei einer Phagozytose durch Neutrophile keine Immunreaktion hervorzurufen (van Assche et al. 2011; van Zandbergen et al. 2007). Um der Immunantwort des Wirts zu entgehen wäre es denkbar, dass Leishmanien durch die gesteigerte Migration von unreifen suppressiven myeloiden Zellen aus dem Blutkreislauf sich einen Vorteil gegenüber dem Immunsystem des Wirts verschaffen. Diese Hypothese liegt der vorliegenden Arbeit zugrunde. Deshalb wurde untersucht, ob sich suppressive Zellen bei einer



Leishmanieninfektion detektieren lassen. Weiterhin wurde geprüft, wie die Parasiten die Funktion der myeloiden Zellen modulieren können, um somit eine T-Zellproliferation zu beeinflussen.

#### **4.1 *in vitro* Charakterisierung von MDSCs in der Leishmaniose**

In (Rößner et al. 2005) ist gezeigt, dass *in vitro* mit GM-CSF kultivierte Knochenmarkzellen eine T-Zellproliferation inhibieren können. Deshalb wurde zunächst ein Vergleich zwischen den *in vitro* generierten MDSCs aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen durchgeführt. In der Publikation von (Rößner et al. 2005) fand man heraus, dass MDSCs aus BALB/c-Knochenmark weniger NO in Proliferationsassays produzieren. Auch in dieser Arbeit konnte dieser Unterschied sowohl auf molekularer Ebene als auch in Suppressionsassays nachgewiesen werden. BALB/c-MDSCs zeigen eine reduzierte iNOS-Expression und iNOS-Aktivität gegenüber C57BL/6-MDSCs. Neben iNOS als Indikator für eine suppressive Eigenschaft, ist die Arginase-1 Expression ebenfalls in BALB/c-MDSCs deutlich geringer. Dies würde für eine reduzierte Fähigkeit von BALB/c-Mäusen zur Generierung von funktionellen MDSCs sprechen. Dem entgegenzusetzen ist die Tatsache, dass MDSCs, die aus Knochenmark von BALB/c-Mäusen generiert wurden, durchaus in der Lage sind, eine CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellproliferation *in vitro* zu supprimieren, obwohl signifikant weniger NO im Suppressionsassay von BALB/c-Mäusen nachgewiesen werden konnte. Vermutlich hat die Kokultur mit Leishmanienantigen-stimulierten T-Zellen eine Expression von Arginase-1 zur Folge, da in (Bronte et al. 2003) beschrieben ist, dass erst eine Aktivierung der MDSCs (BALB/c) durch IL-4 eine suppressive Wirkung durch Arginase-1 hervorruft.

Weiterhin wurde untersucht, ob es Unterschiede zwischen den MDSC-Subtypen in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen gibt. Es zeigte sich, dass aus C57BL/6-Knochenmarkzellen der Subtyp der Mo-MDSCs wesentlich besser differenzieren kann als aus BALB/c-Zellen. Dieser Befund deutet bereits auf ein grundlegend unterschiedliches Differenzierungspotential von myeloiden Zellen der beiden Mausstämmen hin. Auf die Suppressivität hat dies jedoch nur einen geringen Einfluss, denn es konnte gezeigt werden, dass lediglich Mo-MDSCs, nicht aber PMN-MDSCs eine Leishmanienantigen-spezifische T-Zellproliferation hemmen. Da dieser suppressive Zelltyp in BALB/c-Mäusen nur in geringen Anteilen aus Knochenmarkzellen gebildet wird, die Suppression der T-Zellen jedoch vergleichbar mit C57BL/6-MDSCs ist, ist davon auszugehen, dass entweder PMN-MDSCs aus BALB/c-Mäusen für die suppressive Aktivität

verantwortlich sind oder dass die Präsenz geringer Mengen von Mo-MDSCs bereits für eine Suppression ausreicht. Eine genaue Unterscheidung wie in (Rößner et al. 2005) zwischen Ly6G<sup>high</sup> und Ly6G<sup>low</sup> PMN-MDSCs wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da dieser Subtyp im Leishmanienantigen-spezifischen Suppressionsassay keine T-Zellproliferation gehemmt hat. Es ist möglich, dass suppressive Ly6G<sup>low</sup> PMN-MDSCs in BALB/c in höherem Maße vorhanden sind als in C57BL/6 und dadurch die reduzierte Suppression durch Mo-MDSCs unterstützen (Rößner et al. 2005). Eine gestörte Proliferation durch eine sterische Hinderung der MDSCs kann ausgeschlossen werden, da die gleiche Anzahl MDSCs, die mit einem Inhibitor inkubiert wurden, keinen Einfluss auf die Proliferation hatten (Daten nicht gezeigt).

In MDSCs, die aus C57BL/6-Mäusen generiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die gestörte Leishmanienantigen-spezifische T-Zellproliferation NO-abhängig ist. Dieses Resultat spiegelt die Befunde in (Rößner et al. 2005) wider, die die Suppression einer OVA-spezifische T-Zellproliferation durch iNOS-Inhibitoren und iNOS-defizienten MDSCs aufheben konnten. Der Arginase-1 spezifische Inhibitor nor-NOHA konnte die T-Zellproliferation nicht wieder herstellen. Dies kann einerseits auf eine Arginase-1-unabhängige Suppression in C57BL/6-MDSCs zurückzuführen sein, andererseits wurde die Funktionalität des Inhibitors in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft.

Es stellte sich nun die Frage, ob die gezeigten Unterschiede zwischen C57BL/6- und BALB/c-MDSCs durch eine Infektion mit *L. major* beeinflusst wird. Auf molekularer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass durch eine Kokultur von *in vitro* generierten MDSCs mit Leishmanien, sowohl in C57BL/6- als auch BALB/c-Mäusen die iNOS- und Arginase-1-Expression induziert werden kann. Demnach sollten MDSCs durch die Leishmanien-Inkubation die T-Zellsuppression steigern. Überraschenderweise konnte weder in C57BL/6- noch in BALB/c-Suppressionsassays eine erhöhte Suppressivität festgestellt werden. Möglicherweise ist bei Suppressionassays aus C57BL/6-Mäusen keine Steigerung durch eine höhere Expression von suppressiven Faktoren zu erreichen. Im Gegensatz zu C57BL/6-MDSCs verlieren MDSCs aus BALB/c-Mäusen sogar ihrer Suppressivität gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nicht jedoch bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen, nach einer *L. major* Kokultur. Bei einer Leishmanieninfektion spielen die Enzyme iNOS und Arginase-1 eine zentrale Rolle. iNOS ist für eine effektive Bekämpfung nötig wohingegen Arginase-1 die Replikation des Parasiten unterstützt (Sacks und Noben-Trauth 2002; Iniesta et al. 2005). Eine Erklärung für die unterschiedliche Effizienz der Suppression nach einer *L. major* Kokultur, könnte auf die erhöhte Anzahl von Parasiten in BALB/c-MDSCs zurückzuführen sein. Leishmanien sind in

der Lage ebenfalls eine Arginase zu exprimieren (Balaña-Fouce et al. 2012), sind aber nicht dazu fähig das dazu benötigte Substrat L-Arginin herzustellen. Deshalb wird L-Arginin aus der Wirtszelle von Leishmanien aktiv aufgenommen (Balaña-Fouce et al. 2012). Dadurch steht der infizierten BALB/c-MDSC weniger L-Arginin zur Verfügung mit der Folge, dass auch weniger L-Arginin für die NO-Produktion durch iNOS im Zytosol vorhanden ist (Modolell et al. 2009; Munder et al. 2009). Dies könnte eine Ursache für die reduzierte Suppression von BALB/c-MDSCs nach einer *L. major* Inkubation sein. Diese Theorie wird auch durch die Studie von (Sans-Fons et al. 2013) unterstützt. Hier wird gezeigt, dass in Knochenmarkmakrophagen aus BALB/c-Mäusen durch den *cationic amino acid transporter 2* (CAT-2) mehr L-Arginin aufgenommen wird im Vergleich zu Zellen aus C57BL/6-Mäusen. Die Leishmanien haben somit in Zellen aus BALB/c-Mäusen einen Überlebensvorteil, denn sie haben ausreichend L-Arginin für ihr Wachstum zur Verfügung. Kombiniert man diese Daten mit der Tatsache, dass die Expression von iNOS durch T<sub>H</sub>1-Zytokine induziert wird (Sans-Fons et al. 2013), diese aber in BALB/c-Mäusen nicht vorhanden sind, finden die Parasiten in BALB/c-Mäusen die ideale Umgebung vor, um zu replizieren.

Da die Suppression nur bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht aber CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden konnte, lag es nahe, dass möglicherweise ein MHC-Klasse I bzw. MHC-Klasse II abhängiger Suppressionsmechanismus vorliegt. Wenn MDSCs infiziert sind und prozessierte Leishmanienantigene auf MHC-Molekülen präsentieren, wäre das mögliche suppressive MHC-Molekül mit Antigen für eine Suppression ‚blockiert‘. In einem Experiment mit OVA (Ovalbumin)-spezifischen T-Zellen, bei denen durch OVA-Protein stimulierte BMDCs eine Proliferation induziert wurde, konnten MDSCs, die entweder mit OT-I oder OT-II spezifischem OVA inkubiert wurden, weiterhin die T-Zellproliferation inhibieren (Daten nicht gezeigt). Diesem Ergebnis widerspricht die Publikation von (Nagaraj et al. 2012). Hier wird gezeigt, dass MDSCs über MHC-Klasse II Moleküle die IFN $\gamma$ -Sekretion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen antigen-spezifisch inhibieren. Jedoch wurde dieser Effekt in einem von 4 untersuchten Tumormodellen beobachtet. Weiterhin würde eine Verringerung der IFN $\gamma$ -Produktion auch zu einer reduzierten Akkumulierung und Aktivierung der MDSCs führen (Greifenberg et al. 2009; Movahedi et al. 2008). Auch wenn diese Studie im Tumormodell durchgeführt wurde, ist eine eindeutige Interpretation der selektiven Aufhebung des suppressiven Effekts auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch eine *L. major* Kokultur derzeit nicht möglich.

Die *in vitro* generierten MDSCs aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen zeigten gravierende Unterschiede sowohl in ihrem Differenzierungspotential und der Fähigkeit eine Proliferation von Leishmanienantigen-spezifischen T-Zellen zu supprimieren, wenn MDSCs mit *L. major* inkubiert wurden. Wie die meisten Studien, ist auch hier nur *in vitro* untersucht worden, ob eine T-Zellproliferation supprimiert werden kann. Eine *in vivo* Suppression konnte bisher weder in Tumormodellen noch bei anderen Krankheitsbildern nachgewiesen werden. Dennoch wurde *in vivo* untersucht, wie sich der Phänotyp einer MDSC im experimentellen Modell der Leishmaniose in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen verhält.

#### **4.2 *in vivo* Charakterisierung von MDSCs in der Leishmaniose**

Während einer kutanen Leishmaniose ist der Typ der Immunantwort von entscheidender Bedeutung: eine  $T_H1$ -Immunantwort führt zu einer Abheilung, bei einer  $T_H2$ -lastigen Immunreaktion entwickelt sich ein chronischer Verlauf (Sacks und Noben-Trauth 2002; Stebut 2007). Diese beiden Immunantworten wurden in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen verglichen. Dabei wurden Unterschiede in der Zusammensetzung myeloider Zellen oft vernachlässigt. In dieser Arbeit wurden an Tag 10 einer *L. major* Infektion verschiedene Organe auf die Zusammensetzung myeloider Zellsubtypen untersucht. In C57BL/6-Mäusen konnte eine Rekrutierung  $CD11b^+$   $Ly6C^+$   $Ly6G^+$  Zellen aus dem Knochenmark über den Blutkreislauf in das infizierte Fußgewebe nachgewiesen werden (Anstieg der Gesamtzellzahl). Im Gegensatz dazu sind BALB/c-Mäuse nur begrenzt zu einer Generierung und anschließenden Rekrutierung von Mo-MDSCs fähig. Interessanterweise ist sowohl in drainierenden Lymphknoten von C57BL/6-Mäusen als auch BALB/c-Mäusen ein Anstieg von Mo-MDSCs an Tag 10 der Leishmanieninfektion zu erkennen. BALB/c-Mäuse weisen prozentual weniger Mo-MDSCs im Lymphknoten auf als in C57BL/6-Mäusen. Sollte im frühen Verlauf der Leishmaniose dieser Zelltyp einen suppressiven Phänotyp besitzen, müsste in BALB/c-Mäusen eine ungehemmte T-Zellproliferation ablaufen und möglicherweise zu einer besseren Immunantwort führen, was nicht der Fall ist. Weiterhin wird ein Anstieg von phänotypischen Mo-MDSCs an Tag 10 auch in Lymphknoten von C57BL/6-Mäusen nachgewiesen, was auf eine erhöhte Suppression schließen müsste. Der Krankheitsverlauf kann aber dennoch kontrolliert werden, was auf eine effiziente  $T_H1$ -Immunantwort schließen lässt. Am Infektionsort ist eine vergleichbare Situation vorzufinden: in C57BL/6-Mäusen akkumulieren verstärkt Mo-MDSCs, wohingegen in BALB/c-Füßen eine signifikant geringere Anzahl an Mo-MDSCs nachweisbar sind. Auch hier sollte in BALB/c-Mäusen eine

Immunantwort weniger supprimiert sein als in C57BL/6-Mäusen. Es zeichnet sich also ab, dass der Phänotyp einer suppressiven Mo-MDSCs in der Leishmaniose vorhanden ist, aber die T-Zellen nicht effizient supprimiert werden. Somit scheint dieser myeloide Subtyp eine tragende Rolle bei der Bekämpfung der intrazellulären Parasiten zu spielen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigt beispielsweise auch die Studie von (dos Santos et al. 2008), dass eine Depletion von allen Gr-1<sup>+</sup> Zellen (darin enthalten sind sowohl Mo-MDSCs als auch PMN-MDSCs) mit einer reduzierten IL-12- und IFN $\gamma$ -Produktion einhergeht.

In Tumormodellen wird oft durch eine Depletion von Gr-1<sup>+</sup> Zellen beschrieben, dass durch das Fehlen von MDSCs durch eine bessere anti-Tumor Immunreaktion das Tumorwachstum verringert wird (Suzuki et al. 2005; Vincent et al. 2010). Neben MDSCs werden aber auch weitere myeloide Zellen depletiert, die für eine Angiogenese im Tumor wichtig sind. Dadurch kann das beeinträchtigte Tumorwachstum auch auf eine reduzierte Bildung von Gefäßen zurückzuführen sein (Tartour et al. 2011; Srivastava et al. 2012).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Behandlung von infizierten Mäusen mit dem Zytostatikum Gemcitabin führte zu keiner offensichtlichen Veränderung im Krankheitsverlauf in C57BL/6- oder BALB/c-Mäusen. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt, könnte darin liegen, dass bereits nach 5 Tagen die Anzahl myeloider Zellen wieder ähnlich dem Ausgangswert ist und deshalb eine frequentiertere Applikation von Gemcitabin nötig ist (Suzuki et al. 2005). Eine spezifischere Depletion monozytärer Zellen könnte mit Clodronat durchgeführt werden (Moghimi 1997).

Neben den beschriebenen Studien über die Depletion von myeloiden Zellen, wurde in dieser Arbeit eine andere Herangehensweise durchgeführt. Da gezeigt wurde, dass nur Mo-MDSCs *in vitro* einen suppressiven Phänotyp besitzen und nur Mo-MDSCs den Rezeptor CCR2 exprimieren, wurden CCR2-defiziente Mäuse in die vorliegende Arbeit miteinbezogen. Diese Mäuse erlauben es einen Vergleich zwischen Mo-MDSCs, die ein normales Migrationsverhalten und normale Signaltransduktion aufweisen, mit Mo-MDSCs die durch das Fehlen von CCR2 in ihrer Funktionalität eingeschränkt sein sollten. PMN-MDSCs sollten sowohl in Wildtyp- als auch in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen die gleichen Rekrutierungseigenschaften und eine vergleichbare Signaltransduktion aufweisen, da sie keinen CCR2 exprimieren. Wie auch schon in (Quinones et al. 2007) und (Sato et al. 2000) gezeigt wurde, entwickeln CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse eine enorme Fußdickenschwellung nach einer *L. major* Infektion. Eine Erklärung für diesen Phänotyp könnte eine reduzierte Fähigkeit der knock-out Tiere zur Produktion von IFN $\gamma$  sein (Sato et al. 1999). Jedoch zeigt die Studie von (Quinones et al. 2007), dass die IFN $\gamma$ -Sekretion nach einer Leishmanieninfektion mit Wildtyp-Mäusen vergleichbar ist. Diese

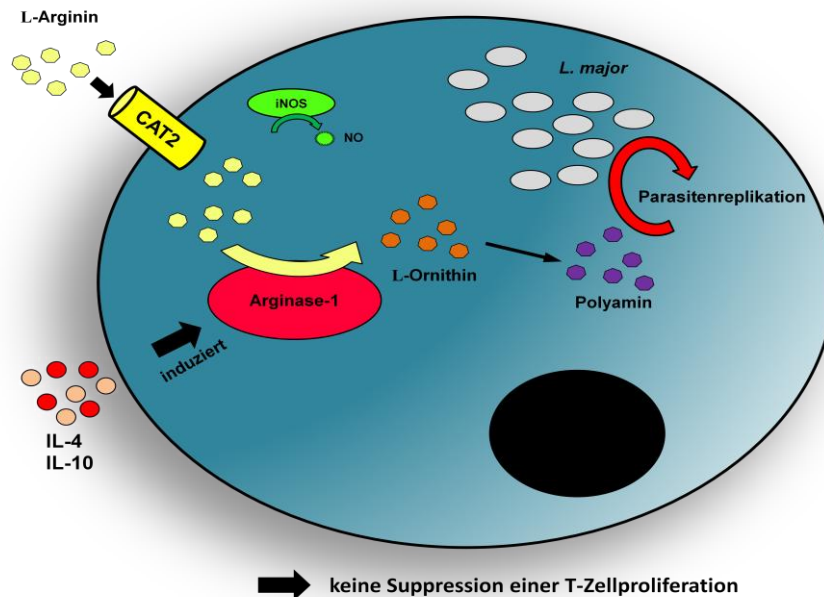
unterschiedlichen Ergebnisse können lediglich auf die unterschiedlichen Leishmanien-Arten zurückzuführen sein (*L. major* in Quinones et al. 2007 und *L. donovani* in Sato et al. 1999). Da es nicht gänzlich geklärt ist inwiefern die IFN $\gamma$ -Produktion in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen den Krankheitsverlauf beeinflusst, wurden weitere Experimente zur Klärung des starken Phänotyps durchgeführt.

Eine Analyse der Organe von infizierten Wildtyp und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte, dass die Rekrutierung von CCR2<sup>+</sup> Mo-MDSCs zum Infektionsort massiv beeinträchtigt ist. In Lymphknoten wurde diese gestörte Migration nur bedingt beobachtet. Auch in Knochenmarkchimären-Mäuse konnte nachgewiesen werden, dass die Rekrutierung von Mo-MDSCs CCR2-abhängig zum infizierten Gewebe erfolgt. Für das Verständnis von MDSCs ist besonders folgender Befund in den Knochenmark-Chimären hervorzuheben: im Lymphknoten sind sowohl Wildtyp als auch CCR2<sup>-/-</sup> Mo-MDSCs vorzufinden. Das bedeutet, dass i) die Migration von CCR2<sup>+</sup> Mo-MDSCs zum drainierenden Lymphknoten CCR2-unabhängig und zum infizierten Gewebe CCR2-abhängig erfolgt, und ii) dass, wenn Mo-MDSCs *in vivo* in der Lage sein sollten eine T-Zellproliferation zu hemmen, diese nicht im Lymphknoten supprimiert werden. Der starke Phänotyp der Fußdickeschwellung in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen kann also nicht darauf zurückgeführt werden, dass durch das Fehlen von Mo-MDSCs eine deregulierte Immunreaktion abläuft.

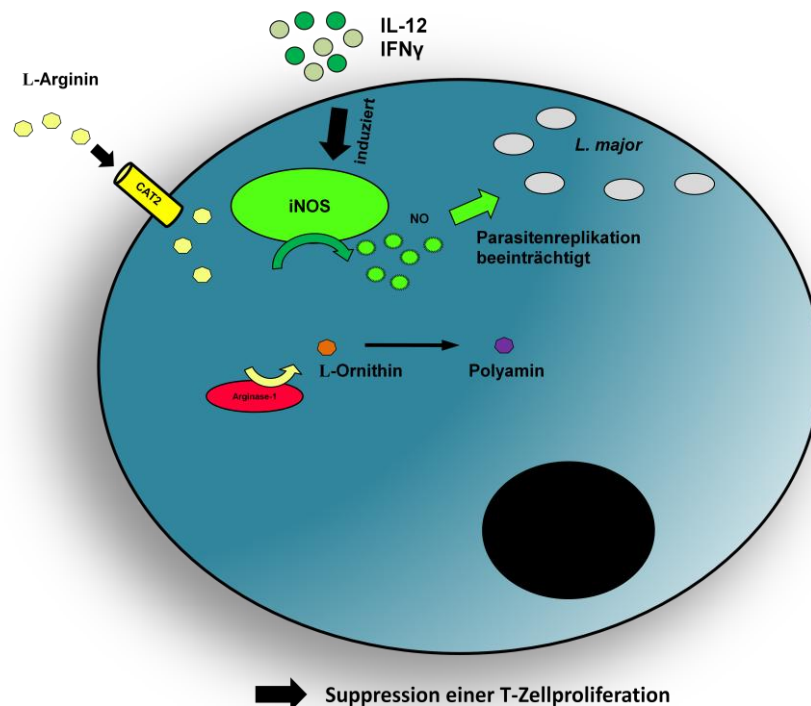
Eine mögliche Erklärung für die Fußdicke in CCR2<sup>-/-</sup>-Tieren, könnte sein, dass weniger CCR2<sup>+</sup>-Vorläuferzellen am Infektionsort vorhanden sind, die zu Makrophagen differenzieren können. Dieser Befund konnte ebenfalls in den Knochenmarkchimären-Mäusen beobachtet werden, da weniger CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Zellen aus CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen im Fuß nachzuweisen sind. Dadurch fehlen wichtige Effektorzellen gegen *L. major* und die Replikation der Parasiten kann überhand nehmen. Nicht auszuschließen ist auch eine ineffiziente Aktivierung durch den fehlenden Chemokin-Rezeptor. In (Ritter und Moll 2000) ist eine synergistische Wirkung von CCL2 und IFN $\gamma$  für das Abtöten von Leishmanien beschrieben. Wenn nun das Signal über den CCR2-Rezeptor zusätzlich zu IFN $\gamma$  fehlt, könnte die effektive Beseitigung der Parasiten beeinträchtigt sein.

Abschließend werden die präsentierten und diskutierten Ergebnisse in einer schematischen Darstellung zusammengefasst. In Abb. 4.2 ist eine hypothetische ‚MDSC‘ in einer BALB/c-Maus dargestellt. Durch die Zytokine IL4 und IL-10 (T<sub>H</sub>2) wird eine Arginase-1 Expression induziert. Durch den Aminosäure-Transporter CAT2 kann die Zelle ausreichend L-Arginin aufnehmen. Der Abbau durch Arginase-1 führt zu einer erhöhten Polyamin-Verfügbarkeit in

der Zelle. Dies führt aber nicht nur zum Zellwachstum, auch die Replikation von *L. major* ist dadurch begünstigt. Die Entstehung von leishmanizidem NO ist hier eingeschränkt, da in BALB/c-Mäusen wenig IFN $\gamma$  vorhanden ist. Dies würde eine Erklärung für den Verlust der



**Abb. 4.1: Situation einer infizierten ‚MDSC‘ in BALB/c-Mäusen.** Erklärung siehe Text. Abkürzungen: CAT2 = cationic amino acid transporter 2; iNOS = induzierbare NO-Synthase; NO = Stickstoffmonoxid



**Abb. 4.2: Situation einer infizierten ‚MDSC‘ in C57BL/6-Mäusen.** Erklärung siehe Text. Abkürzungen: CAT2 = cationic amino acid transporter 2; iNOS = induzierbare NO-Synthase; NO = Stickstoffmonoxid

Suppressivität gegenüber  $CD4^+$  T-Zellen sein, da hier  $L$ -Arginin überwiegend durch Arginase-1 verstoffwechselt wird und dadurch das Parasitenwachstum fördert. Dies führt ebenso zu einer geringeren NO-Produktion aufgrund der geringeren  $L$ -Arginin Verfügbarkeit im Cytosol und infolgedessen auch zu einem eingeschränkterem suppressiven Potential. Im Gegensatz zu BALB/c-Mäusen, wird in C57BL/6-Mäusen (Abb. 4.3) die iNOS-Expression durch  $IFN\gamma$  induziert. Die Aufnahme von  $L$ -Arginin ist hier zwar durch eine geringere CAT2-Verfügbarkeit begrenzt, jedoch wird in C57BL/6-Zellen weniger Arginase-1 exprimiert, sodass sowohl weniger Polyamin für die Leishmanienreplikation als auch verstärkt leishmanizides NO produziert wird. Die Suppression wird dadurch nicht beeinträchtigt, da weiterhin NO durch iNOS entstehen kann.

C57BL/6 ,MDSCs‘	BALB/c ,MDSCs‘
	
<u><i>in vivo</i></u> :	<u><i>in vivo</i></u> :
<b>Rekrutierung</b> zum Infektionsort und Lymphknoten	<b>reduzierte Rekrutierung</b> zum Infektionsort und Lymphknoten
<u><i>in vitro</i></u> :	<u><i>in vitro</i></u> :
suppressive Aktivität: ✓	suppressive Aktivität: ✓
→ iNOS-abhängig: ✓	→ iNOS-abhängig: ?
→ Arginase-1-abhängig: ? (✗)	→ Arginase-1-abhängig: ?
Anzahl <i>L. major</i> nach Phagozytose: <b>moderat</b>	Anzahl <i>L. major</i> nach Phagozytose: <b>erhöht</b>
iNOS + Arginase-1 Expression: ✓	iNOS + Arginase-1 Expression: <b>reduziert</b>
<u><i>in vitro</i></u> + <i>L. major</i> :	<u><i>in vitro</i></u> + <i>L. major</i> :
suppressive Aktivität: ✓	suppressive Aktivität: ✗
NO-Produktion nach Infektion: ✓	NO-Produktion nach Infektion: <b>reduziert</b>
→ <b>Funktionelle ‘MDSCs’, aber Kontrolle der <i>L. major</i> -Infektion</b>	→ <b>Funktionsverlust von ‘MDSCs’ nach <i>L. major</i>-Infektion, aber chronischer Krankheitsverlauf</b>

Abb. 4.3: Schematische Gegenüberstellung der präsentierten und diskutierten Ergebnisse.



## 5. Zusammenfassung

Die erfolgreiche Eliminierung des intrazellulären Parasiten *L. major* ist abhängig von der adaptiven Immunantwort des Wirts. Werden Zytokine produziert, die überwiegend in  $T_H1$ -dominierten Immunreaktionen vorzufinden sind (z.B.  $IFN\gamma$ , IL-12), können infizierte Makrophagen durch die Produktion leishmanizider Moleküle die Parasiten effizient eliminieren. Bei einer  $T_H2$ -Immunreaktion entwickelt sich dagegen ein chronischer Krankheitsverlauf, was auf eine erhöhte IL-4- und reduzierte  $IFN\gamma$ -Produktion zurückzuführen ist. Im Mausmodell können diese unterschiedlichen Immunreaktionen in zwei Mausstämmen beobachtet werden: C57BL/6-Mäuse sind in der Lage eine *L. major* Infektion abzuheilen, wohingegen es BALB/c-Mäusen nicht möglich ist die Infektion zu kontrollieren. Neben dendritischen Zellen, die überwiegend für die Induktion einer adaptiven T-Zellantwort verantwortlich sind, nehmen andere myeloide Zellen unterschiedliche Funktionen ein. So sind Makrophagen einerseits Wirtszellen in denen die Parasiten replizieren können, andererseits agieren sie auch, wie oben bereits beschrieben, als Effektorzellen des Immunsystems. Myeloide Zellen sind aber nicht nur in der Lage eine Immunantwort zu unterstützen. Seit mehreren Jahren wird beschrieben, dass sogenannte myeloide Suppressorzellen (engl.: *myeloid-derived suppressor cells*; MDSCs) eine Immunreaktion mittels der suppressiven Faktoren iNOS und Arginase-1 auch supprimieren können. In der vorliegenden Arbeit wurden deren Eigenschaften und Funktionalität während einer Leishmaniose untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Mausstämme C57BL/6 und BALB/c in ihrer Zusammensetzung myeloider Zellen unterscheiden. Insbesondere weisen BALB/c-Mäuse im Knochenmark, Blut, Lymphknoten und am Infektionsort einen geringeren Anteil monozytärer MDSCs (Mo-MDSCs) auf. Sowohl *in vitro* generierte MDSCs aus C57BL/6- als auch BALB/c-Mäusen können eine Leishmanienantigen-spezifische T-Zellproliferation hemmen. Obwohl MDSCs aus BALB/c-Mäusen eine T-Zellproliferation supprimieren, wurde auf mRNA-Ebene eine geringere iNOS und Arginase-1 Expression als in C57BL/6-MDSCs nachgewiesen. Auch der Nitrit-Gehalt in Überständen von Suppressionsassays von BALB/c-Mäusen war signifikant geringer als in Suppressionsassays aus C57BL/6-Mäusen. Für C57BL/6-MDSCs dagegen konnte ein iNOS/NO-abhängiger Suppressionsmechanismus detektiert werden. Um den Einfluss von *L. major* Parasiten auf die Funktionalität von MDSCs zu untersuchen, wurden MDSCs vor einem Suppressionassay mit Parasiten kokultiviert.

Nach der Kokultur zeigte sich, dass MDSCs aus BALB/c-Mäusen ihre Fähigkeit eine  $CD4^+$  T-Zellproliferation zu hemmen verlieren. Um zu prüfen, ob die Aufhebung der Suppressivität

mit dem chronischen Krankheitsverlauf, und damit einer deregulierten Immunantwort einhergeht, wurden C-C Chemokinrezeptor 2 (CCR2) - defiziente Mäuse (C57BL/6 Hintergrund) verwendet. In diesen Mäusen wird auf Mo-MDSCs kein CCR2 exprimiert und zeigen dadurch eine eingeschränkte Rekrutierung zum Infektionsort. Nach einer Leishmanieninfektion zeigen CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse eine enorme Fußdickeschwellung. Es wurden weniger Mo-MDSCs im Infiltrat im Fußgewebe identifiziert. In Knochenmarkchimären-Mäusen, die 50% Wildtyp und 50% CCR2<sup>-/-</sup>-Knochenmark transferiert bekamen, konnte in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen der starke Phänotyp aufgehoben werden. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Migration von Mo-MDSCs in den drainierenden Lymphknoten CCR2-unabhängig verläuft, zum Infektionsort allerdings CCR2-abhängig. Daher kann der Verlauf der Leishmaniose in CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht auf eine deregulierte Immunreaktion aufgrund fehlender Mo-MDSC im Lymphknoten zurückzuführen sein. Vielmehr könnte durch die eingeschränkte Rekrutierung von Mo-MDSCs zum Infektionsort die Replikation der Parasiten gefördert werden, was nicht auf eine suppressive Funktion dieser unreifen myeloiden Zellen in der Leishmaniose schließen lässt.

Aufgrund der durchgeführten Experimente kann zwar der Phänotyp einer myeloiden Suppressorzelle während einer Leishmaniose nachgewiesen werden, deren Funktionalität bzw. Relevanz *in vivo* kann mit den heutigen experimentellen Mitteln jedoch nicht einwandfrei bestätigt werden.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Das mononukleäre Phagozyten-System

Abb. 1.2: Die MDSC-Subtypen

Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus der Leishmanien

Abb. 1.4: Patienten mit Leishmaniosesymptomen

Abb. 1.5: Krankheitsverlauf der experimentellen Leishmaniose

Abb. 2.1: Schematischer Aufbau des leishmanienspezifischen T-Zell Suppressionsassays

Abb. 2.2: Schema zur Generierung von Mäusen mit chimärem Knochenmark

Abb. 3.1: Zusammensetzung myeloider Zellen im Knochenmark von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

Abb. 3.2: Zusammensetzung myeloider Zellen im Blut von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

Abb. 3.3: Zusammensetzung myeloider Zellen in der Milz von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

Abb. 3.4: Zusammensetzung myeloider Zellen in poplitealen Lymphknoten von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

Abb. 3.5: Zusammensetzung myeloider Zellen im Fussgewebe von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

Abb. 3.6: Histologische Cryostat-Schnitte von poplitealen Lymphknoten aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen

Abb. 3.7: Histologische Cryostat-Schnitte von poplitealen Lymphknoten aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

Abb. 3.8: Durchflusszytometrische Analyse von *in vitro* kultivierten Knochenmarkszellen mit GM-CSF

Abb. 3.9: Ko-Kultur von *in vitro* MDSCs (C57BL/6) mit CFSE-markierten *L. major*

Abb. 3.10: Ko-Kultur von *in vitro* MDSCs (C57BL/6) mit CFSE-markierten *L. major*

Abb. 3.11: Ko-Kultur von *in vitro* MDSCs aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen mit CFSE-markierten *L. major*

Abb. 3.12: Kinetik der Arginase-1 und iNOS Expression von *in vitro* generierten MDSCs aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen

Abb. 3.13: Arginase-1 und iNOS Expression von *in vitro* generierten MDSCs aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen nach *L. major* Infektion

Abb. 3.14: Arginase-1 und iNOS Expression von *in vitro* generierten Mo-MDSCs aus C57BL/6- und BALB/c-Mäusen

- Abb. 3.15: Leishmanienantigen-spezifischer Suppressionsassay
- Abb. 3.16: Nitrit-Gehalt in Überständen von Leishmanienantigen-spezifischen Suppressionsassays
- Abb. 3.17: Stimulation von *in vitro* MDSCs mit ATRA
- Abb. 3.18: Arginase-1 und iNOS Expression von *in vitro* generierten MDSCs aus C57BL/6 und BALB/c Mäusen mit und ohne ATRA Stimulation
- Abb. 3.19: Leishmanienantigen-spezifischer Suppressionsassay mit ATRA stimulierten MDSCs
- Abb. 3.20: Leishmanienantigen-spezifischer Suppressionsassay mit Arginase-1- und iNOS-Inhibitoren (C57BL/6)
- Abb. 3.21: Zusammensetzung myeloider Zellen im Knochenmark von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion
- Abb. 3.22: Zusammensetzung myeloider Zellen im Blut von C57BL/6 und BALB/c Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion
- Abb. 3.23: Zusammensetzung myeloider Zellen in der Milz von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion
- Abb. 3.24: Zusammensetzung myeloider Zellen in poplitealen Lymphknoten von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion
- Abb. 3.25: Zusammensetzung myeloider Zellen im Fußgewebe von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion
- Abb. 3.26: Proliferierende Mo-MDSCs im Knochenmark, Blut, Lymphknoten und Fußgewebe von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion
- Abb. 3.27: Proliferierende PMN-MDSCs im Knochenmark, Blut, Lymphknoten und Fußgewebe von C57BL/6- und BALB/c-Mäusen nach 10-tägiger *L. major* Infektion
- Abb. 3.28: Gemcitabin Behandlung während einer *L. major* Infektion in C57BL/6- und BALB/c-Mäusen
- Abb. 3.29: Durchflusszytometrische Analyse der CCR2-Expresion von *in vitro* generierten MDSCs
- Abb. 3.30: Verlauf der einer *L. major* Infektion in C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen
- Abb. 3.31: Durchflusszytometrische Analyse von Mo-MDSCs im Knochenmark und Blut von C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 38 einer *L. major* Infektion
- Abb. 3.32: Durchflusszytometrische Analyse von PMN-MDSCs im Knochenmark und Blut von C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 38 einer *L. major* Infektion

- Abb. 3.33: Durchflusszytometrische Analyse von Mo-MDSCs im Fußgewebe und poplitealen Lymphknoten von C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 10 einer *L. major* Infektion
- Abb. 3.34: Durchflusszytometrische Analyse von PMN-MDSCs im Fußgewebe und poplitealen Lymphknoten von C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 10 einer *L. major* Infektion
- Abb. 3.35: Bestimmung der Parasiten-Last im Fußgewebe von C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 38
- Abb. 3.36: Leishmanien-spezifischer IgG-Titer im Serum von infizierten C57BL/6- und CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen
- Abb. 3.37: Rekonstitution im Blut von Knochenmark-Chimären Mäusen
- Abb. 3.38: Verlauf einer *L. major* Infektion in Knochenmark-Chimären
- Abb. 3.39: Durchflusszytometrische Analyse des Fußgewebes aus (WT +CCR2<sup>-/-</sup> → WT; oben)- und (WT +CCR2<sup>-/-</sup> → CCR2<sup>-/-</sup>; unten)-Mäusen während einer *L. major* Infektion
- Abb. 3.40: Durchflusszytometrische Analyse der Lymphknoten aus (WT +CCR2<sup>-/-</sup> → WT; oben)- und (WT +CCR2<sup>-/-</sup> → CCR2<sup>-/-</sup>; unten)-Mäusen während einer *L. major* Infektion
- Abb. 4.1: Situation einer infizierten ‚MDSC‘ in BALB/c-Mäusen.
- Abb. 4.2: Situation einer infizierten ‚MDSC‘ in C57BL/6-Mäusen
- Abb. 4.3: Schematische Gegenüberstellung der präsentierten und diskutierten Ergebnisse

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abbas, A. K. (1989): Antigen presentation by B lymphocytes: mechanisms and functional significance. In: *Semin. Immunol.* (1), S. 5–12.
2. Auffray, C.; Fogg, D.; Garfa, M.; Elain, G.; Join-Lambert, O.; Kayal, S. et al. (2007): Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. In: *Science* (5838), S. 666–670.
3. Bachmann, Martin F.; Kopf, Manfred; Marsland, Benjamin J. (2006): Chemokines: more than just road signs. In: *Nat. Rev. Immunol.* (2), S. 159–164.
4. Baggiolini, Marco (1998): Chemokines and leukocyte traffic. In: *Nature* (6676), S. 565–568.
5. Balaña-Fouce, Rafael; Calvo-Álvarez, Estefanía; Álvarez-Velilla, Raquel; Prada, Christopher F.; Pérez-Pertejo, Yolanda; Reguera, Rosa M. (2012): Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. In: *Molecular and Biochemical Parasitology* (2), S. 85–93.
6. Blum, Janice S.; Wearsch, Pamela A.; Cresswell, Peter (2013): Pathways of antigen processing. In: *Annu. Rev. Immunol.*, S. 443–473.
7. Blum, Johannes A.; Hatz, Christoph F. (2009): Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Travelers 2009. In: *Journal of Travel Medicine* (2), S. 123–131.
8. Bogdan, C.; Röllinghoff, M. (1999): How do protozoan parasites survive inside macrophages? In: *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* (1), S. 22–28.
9. Brewig, Nancy; Kissenpfennig, Adrien; Malissen, Bernard; Veit, Alexandra; Bickert, Thomas; Fleischer, Bernhard et al. (2009): Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. In: *J. Immunol.* (2), S. 774–783.
10. Bronte, Vincenzo; Serafini, Paolo; Santo, Carmela de; Marigo, Ilaria; Tosello, Valeria; Mazzoni, Alessandra et al. (2003): IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. In: *J. Immunol.* (1), S. 270–278.
11. Carter, S. B. (1967): Haptotaxis and the mechanism of cell motility. In: *Nature* (5073), S. 256–260.
12. Cumano, Ana; Godin, Isabelle (2007): Ontogeny of the Hematopoietic System. In: *Annu. Rev. Immunol.* (1), S. 745–785.
13. Dong, Chen (2008): TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. In: *Nat. Rev. Immunol.* (5), S. 337–348.
14. dos Santos, Milla Schmaltz Tatice; Vaz Cardoso, Ludimila Paula; Nascimento, Gustavo Rios; Lino, Ruy de Sousa; Dorta, Miriam Leandro; Oliveira, Milton Adriano Pelli de; Ribeiro-Dias, Fátima (2008): *Leishmania major*: Recruitment of Gr-1+ cells

- into draining lymph nodes during infection is important for early IL-12 and IFN $\gamma$  production. In: *Experimental Parasitology* (3), S. 403–410.
15. Du Plessis, Nelita; Loebenberg, Laurianne; Kriel, Magdalena; Groote-Bidlingmaier, Florian von; Ribechini, Eliana; Loxton, Andre G. et al. (2013): Increased Frequency of Myeloid-derived Suppressor Cells during Active Tuberculosis and after Recent Mycobacterium tuberculosis Infection Suppresses T-Cell Function. In: *Am J Respir Crit Care Med* (6), S. 724–732.
  16. Gabrilovich, Dmitry I.; Nagaraj, Srinivas (2009): Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. In: *Nat Rev Immunol* (3), S. 162–174.
  17. Gabrilovich, Dmitry I.; Ostrand-Rosenberg, Suzanne; Bronte, Vincenzo (2012): Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. In: *Nat Rev Immunol* (4), S. 253–268.
  18. Gaines, P.; Berliner, N. (2003): Retinoids in myelopoiesis. In: *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* (1), S. 46–65.
  19. Germain, Ronald N. (2002): T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. In: *Nat. Rev. Immunol.* (5), S. 309–322.
  20. Gordon, Siamon; Taylor, Philip R. (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. In: *Nat Rev Immunol* (12), S. 953–964.
  21. Greifengberg, Verena; Ribechini, Eliana; Rößner, Susanne; Lutz, Manfred B. (2009): Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN- $\gamma$  treatment impairs DC development. In: *Eur. J. Immunol.* (10), S. 2865–2876.
  22. Haile, Lydia A.; Wasielewski, Reinhard von; Gamrekelashvili, Jaba; Krüger, Christine; Bachmann, Oliver; Westendorf, Astrid M. et al. (2008): Myeloid-Derived Suppressor Cells in Inflammatory Bowel Disease: A New Immunoregulatory Pathway. In: *Gastroenterology* (3), S. 871–881.e5.
  23. Imhof, Beat A.; Aurrand-Lions, Michel (2004): Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. In: *Nat. Rev. Immunol.* (6), S. 432–444.
  24. Iniesta, Virginia; Carcelén, Jesualdo; Molano, Isabel; Peixoto, Pablo M. V.; Redondo, Eloy; Parra, Pilar et al. (2005): Arginase I induction during Leishmania major infection mediates the development of disease. In: *Infect. Immun.* (9), S. 6085–6090.
  25. Jirillo E.; Brandonisio O. (Hg.) (2010): Immune responses to parasitic infections. Presentation of skin-derived Leishmania antigen by dendritic cell subtypes: Bentham eBooks.
  26. K. Murphy; P. Travers; M. Walport (Hg.) (2009): Janeway Immunologie. 7. Aufl.: Spektrum Verlag.
  27. Kato, Hiroto; Gomez, Eduardo A.; Cáceres, Abraham G.; Uezato, Hiroshi; Mimori, Tatsuyuki; Hashiguchi, Yoshihisa (2010): Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. In: *IJERPH* (3), S. 814–826.

28. Kolaczowska, Elzbieta; Kubes, Paul (2013): Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. In: *Nat Rev Immunol* (3), S. 159–175.
29. Le, Hanh K.; Graham, Laura; Cha, Esther; Morales, Johanna K.; Manjili, Masoud H.; Bear, Harry D. (2009): Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. In: *International Immunopharmacology* (7-8), S. 900–909.
30. León, Beatriz; López-Bravo, María; Ardavín, Carlos (2007): Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. In: *Immunity* (4), S. 519–531.
31. Lesokhin, A. M.; Hohl, T. M.; Kitano, S.; Cortez, C.; Hirschhorn-Cymerman, D.; Avogadri, F. et al. (2012): Monocytic CCR2+ Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Immune Escape by Limiting Activated CD8 T-cell Infiltration into the Tumor Microenvironment. In: *Cancer Research* (4), S. 876–886.
32. Lin, Hsi-Hsien; Stacey, Martin; Stein-Streilein, Joan; Gordon, Siamon (2010): F4/80: the macrophage-specific adhesion-GPCR and its role in immunoregulation. In: *Adv. Exp. Med. Biol.*, S. 149–156.
33. Lutz, M. B.; Kukutsch, N.; Ogilvie, A. L.; Rössner, S.; Koch, F.; Romani, N.; Schuler, G. (1999): An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. In: *J. Immunol. Methods* (1), S. 77–92.
34. Mack, M.; Cihak, J.; Simonis, C.; Luckow, B.; Proudfoot, A. E.; Plachý, J. et al. (2001): Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. In: *J. Immunol.* (7), S. 4697–4704.
35. MacMicking, John; Xie, Qiao-wen; Nathan, Carl (1997): Nitric Oxide and Macrophage Function. In: *Annu. Rev. Immunol.* (1), S. 323–350.
36. Martinon, Fabio; Tschopp, Jürg (2005): NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. In: *Trends Immunol.* (8), S. 447–454.
37. Maslov, D. A.; Podlipaev, S. A.; Lukes, J. (2001): Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. In: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (3), S. 397–402.
38. McCarthy, J. B.; Palm, S. L.; Furcht, L. T. (1983): Migration by haptotaxis of a Schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. In: *J. Cell Biol.* (3), S. 772–777.
39. McGreal, Eamon P.; Miller, Joanna L.; Gordon, Siamon (2005): Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. In: *Curr. Opin. Immunol.* (1), S. 18–24.
40. Melgarejo, Esther; Medina, Miguel Ángel; Sánchez-Jiménez, Francisca; Urdiales, José Luis (2009): Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory



- processes. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (5), S. 998–1001.
41. Mirza, N. (2006): All-trans-Retinoic Acid Improves Differentiation of Myeloid Cells and Immune Response in Cancer Patients. In: *Cancer Research* (18), S. 9299–9307.
  42. Modolell, Manuel; Choi, Beak-San; Ryan, Robert O.; Hancock, Maggie; Titus, Richard G.; Abebe, Tamrat et al. (2009): Local Suppression of T Cell Responses by Arginase-Induced L-Arginine Depletion in Nonhealing Leishmaniasis. In: *PLoS Negl Trop Dis* (7), S. e480.
  43. Moghimi, S. M. (1997): Apoptotic cell death in activated monocytes following incorporation of clodronate-liposomes. In: *J. Leukoc. Biol.* (5), S. 643–645.
  44. Movahedi, K.; Guilleams, M.; van den Bossche, J.; van den Bergh, R.; Gysemans, C.; Beschin, A. et al. (2008): Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. In: *Blood* (8), S. 4233–4244.
  45. Munder, Markus; Choi, Beak-San; Rogers, Matthew; Kropf, Pascale (2009): L-Arginine deprivation impairs *Leishmania* major-specific T-cell responses. In: *Eur. J. Immunol.* (8), S. 2161–2172.
  46. Murray, Henry W.; Berman, Jonathan D.; Davies, Clive R.; Saravia, Nancy G. (2005): Advances in leishmaniasis. In: *The Lancet* (9496), S. 1561–1577.
  47. Nagaraj, S.; Nelson, A.; Youn, J.-i; Cheng, P.; Quiceno, D.; Gabrilovich, D. I. (2012): Antigen-Specific CD4<sup>+</sup> T Cells Regulate Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer via Retrograde MHC Class II Signaling. In: *Cancer Research* (4), S. 928–938.
  48. Pereira, W. F.; Ribeiro-Gomes, F. L.; Guillermo, L. V. C.; Vellozo, N. S.; Montalvao, F.; DosReis, G. A.; Lopes, M. F. (2011): Myeloid-derived suppressor cells help protective immunity to *Leishmania* major infection despite suppressed T cell responses. In: *Journal of Leukocyte Biology* (6), S. 1191–1197.
  49. Pieper, Kathrin; Grimbacher, Bodo; Eibel, Hermann (2013): B-cell biology and development. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (4), S. 959–971.
  50. Proudfoot, Amanda E. I. (2002): Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. In: *Nat. Rev. Immunol.* (2), S. 106–115.
  51. Quinones, M. P.; Estrada, C. A.; Jimenez, F.; Martinez, H.; Willmon, O.; Kuziel, W. A. et al. (2007): CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against *Leishmania* major. In: *Parasite Immunol* (4), S. 211–217.
  52. Reiner, S. L.; Locksley, R. M. (1995): The Regulation of Immunity to *Leishmania* Major. In: *Annu. Rev. Immunol.* (1), S. 151–177.

- 
53. Ritter, U.; Moll, H. (2000): Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of leishmania major by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. In: *Eur. J. Immunol.* (11), S. 3111–3120.
54. Ritter, Uwe; Frischknecht, Freddy; van Zandbergen, Ger (2009): Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? In: *Trends in Parasitology* (11), S. 505–510.
55. Ritter, Uwe; Mattner, Jochen; Rocha, Janaina Soares; Bogdan, Christian; Körner, Heinrich (2004): The control of Leishmania (Leishmania) major by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. In: *Microbes and Infection* (6), S. 559–565.
56. Rose, Shawn; Misharin, Alexander; Perlman, Harris (2012): A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. In: *Cytometry* (4), S. 343–350.
57. Rößner, Susanne; Voigtländer, Constanze; Wiethe, Carsten; Hänig, Jens; Seifarth, Christian; Lutz, Manfred B. (2005): Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. In: *Eur. J. Immunol.* (12), S. 3533–3544.
58. Sacks, David; Noben-Trauth, Nancy (2002): The immunology of susceptibility and resistance to leishmania major in mice. In: *Nat Rev Immunol* (11), S. 845–858.
59. Sakaguchi, Shimon; Miyara, Makoto; Costantino, Cristina M.; Hafler, David A. (2010): FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. In: *Nat Rev Immunol* (7), S. 490–500.
60. Sans-Fons, M. G.; Yeramian, A.; Pereira-Lopes, S.; Santamaria-Babi, L. F.; Modolell, M.; Lloberas, J.; Celada, A. (2013): Arginine Transport Is Impaired in C57Bl/6 Mouse Macrophages as a Result of a Deletion in the Promoter of Slc7a2 (CAT2), and Susceptibility to Leishmania Infection Is Reduced. In: *Journal of Infectious Diseases* (11), S. 1684–1693.
61. Sato, N.; Ahuja, S. K.; Quinones, M.; Kostecki, V.; Reddick, R. L.; Melby, P. C. et al. (2000): CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the Leishmania major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. In: *J. Exp. Med.* (2), S. 205–218.
62. Sato, N.; Kuziel, W. A.; Melby, P. C.; Reddick, R. L.; Kostecki, V.; Zhao, W. et al. (1999): Defects in the generation of IFN-gamma are overcome to control infection with Leishmania donovani in CC chemokine receptor (CCR) 5-, macrophage inflammatory protein-1 alpha-, or CCR2-deficient mice. In: *J. Immunol.* (10), S. 5519–5525.
63. Schmid, Maximilian; Wege, Anja K.; Ritter, Uwe (2012): Characteristics of “Tip-DCs and MDSCs” and Their Potential Role in Leishmaniasis. In: *Front. Microbio.*

- 
64. Schulz, Alexandra; Mellenthin, Katja; Schöni, Gabriele; Fleischer, Bernhard; Drosten, Christian (2003): Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. In: *J. Clin. Microbiol.* (4), S. 1529–1535.
65. Serbina, Natalya V.; Jia, Ting; Hohl, Tobias M.; Pamer, Eric G. (2008): Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. In: *Annu. Rev. Immunol.* (1), S. 421–452.
66. Serbina, Natalya V.; Kuziel, William; Flavell, Richard; Akira, Shizuo; Rollins, Barrett; Pamer, Eric G. (2003): Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. In: *Immunity* (6), S. 891–901.
67. Serbina, Natalya V.; Pamer, Eric G. (2006): Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. In: *Nat Immunol* (3), S. 311–317.
68. Sousa-Canavez, Juliana Moreira de; Oliveira Massoco, Cristina de; Moraes-Vasconcelos, Dewton de; Corneta, Elaine Cristina; Leite, Katia Ramos Moreira; Camara-Lopes, Luiz Heraldo (2009): Retinoic acid inhibits dendritic cell differentiation driven by interleukin-4. In: *Cellular Immunology* (1), S. 41–48.
69. Srivastava, Minu K.; Zhu, Li; Harris-White, Marni; Kar, Upendra; Huang, Min; Johnson, Ming F. et al. (2012): Myeloid Suppressor Cell Depletion Augments Antitumor Activity in Lung Cancer. In: *PLoS ONE* (7), S. e40677.
70. Stebut, E.; Schleicher, U.; Bogdan, C. (2012): Kutane Leishmaniasis als Reisedermatose. In: *Hautarzt* (3), S. 233–249.
71. Stebut, Esther von (2007): Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. In: *Eur J Dermatol* (2), S. 115–122.
72. Sunderkötter, Cord; Nikolic, Tatjana; Dillon, Marilyn J.; van Rooijen, Nico; Stehling, Martin; Drevets, Douglas A.; Leenen, Pieter J. M. (2004): Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. In: *J. Immunol.* (7), S. 4410–4417.
73. Suzuki, Eiji; Kapoor, Veena; Jassar, Arminder Singh; Kaiser, Larry R.; Albelda, Steven M. (2005): Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. In: *Clin. Cancer Res.* (18), S. 6713–6721.
74. Tartour, Eric; Pere, H.; Maillere, B.; Terme, M.; Merillon, N.; Taieb, J. et al. (2011): Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. In: *Cancer Metastasis Rev* (1), S. 83–95.

- 
75. Taschner, S.; Koesters, C.; Platzer, B.; Jorgl, A.; Ellmeier, W.; Benesch, T.; Strobl, H. (2006): Down-regulation of RXR expression is essential for neutrophil development from granulocyte/monocyte progenitors. In: *Blood* (3), S. 971–979.
76. Trinchieri, Giorgio; Sher, Alan (2007): Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. In: *Nat. Rev. Immunol.* (3), S. 179–190.
77. Umemura, N.; Saio, M.; Suwa, T.; Kitoh, Y.; Bai, J.; Nonaka, K. et al. (2008): Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. In: *Journal of Leukocyte Biology* (5), S. 1136–1144.
78. van Assche, Tim; Deschacht, Maartje; da Luz, Raquel A. Inocêncio; Maes, Louis; Cos, Paul (2011): Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. In: *Free Radical Biology and Medicine* (2), S. 337–351.
79. van Genderachter, Jo A.; Beschin, Alain; Baetselier, Patrick de; Raes, Geert (2010): Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. In: *Eur. J. Immunol.* (11), S. 2976–2985.
80. van Zandbergen, G.; Solbach, W.; Laskay, T. (2007): Apoptosis driven infection. In: *Autoimmunity* (4), S. 349–352.
81. van Zandbergen, Ger; Klinger, Matthias; Mueller, Antje; Dannenberg, Sonja; Gebert, Andreas; Solbach, Werner; Laskay, Tamás (2004): Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. In: *J. Immunol.* (11), S. 6521–6525.
82. Vincent, J.; Mignot, G.; Chalmin, F.; Ladoire, S.; Bruchard, M.; Chevriaux, A. et al. (2010): 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity. In: *Cancer Research* (8), S. 3052–3061.
83. Walter, U.; Waldmann, R.; Nieberding, M. (1988): Intracellular mechanism of action of vasodilators. In: *Eur. Heart J.*, S. 1–6.
84. Wolpe, S. D.; Davatelis, G.; Sherry, B.; Beutler, B.; Hesse, D. G.; Nguyen, H. T. et al. (1988): Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. In: *J. Exp. Med.* (2), S. 570–581.
85. Wu, G.; Morris, S. M. (1998): Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. In: *Biochem. J.*, S. 1–17.
86. Yadav, Amita; Saini, Vandana; Arora, Sarika (2010): MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. In: *Clinica Chimica Acta* (21-22), S. 1570–1579.
87. Yi, H.; Guo, C.; Yu, X.; Zuo, D.; Wang, X.-Y (2012): Mouse CD11b+Gr-1+ Myeloid Cells Can Promote Th17 Cell Differentiation and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. In: *The Journal of Immunology* (9), S. 4295–4304.
88. Yona, Simon; Jung, Steffen (2010): Monocytes: subsets, origins, fates and functions. In: *Current Opinion in Hematology* (1), S. 53–59.

89. Young, M. R.; Newby, M.; Wepsic, H. T. (1987): Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. In: *Cancer Res.* (1), S. 100–105.

## 8. Anhang

Manuskripte die in Zusammenhang mit dieser Arbeit entstanden sind:

Maximilian Schmid, Anja K. Wege und Uwe Ritter

**„Characteristics of ‘Tip-DCs and MDSCs’ and their potential role in Leishmaniasis”**

Publiziert in Frontiers in Microbiology, März 2012

(doi: 10.3389/fmicb.2012.00074; PMID: 22416241)

Anja K. Wege, Christian Florian, Wolfgang Ernst, Nicole Zimara, Ulrike Schleicher, Frank Hanses, Maximilian Schmid und Uwe Ritter

**“Leishmania major infection in humanized mice induces systemic infection and provokes a nonprotective human immune response”**

Publiziert in PLoS Neglected Tropical Diseases, Juli 2012

(doi: 10.1371/journal.pntd.0001741; PMID: 22848771)

Maximilian Schmid, Nicole Zimara, Anja K. Wege und Uwe Ritter

**„Divergent myeloid-derived suppressor cell functionality and host pathogen interactions in C57BL/6 and BALB/ mice”** (Vorläufiger Titel)

Eingereicht bei European Journal of Immunology am 26.11.2013 (Status: *under Revision*)

### Vortrag:

**“Characterization of myeloid suppressor cell activity in experimental leishmaniasis”**

16. Symposium "Infektion und Immunabwehr“, Burg Rothenfels, 08.-10.03.2012

### Posterpräsentationen:

**“The homing of myeloid-derived suppressor cells and interaction with leucocytes differs between C57BL/6 and BALB/c after infection with *Leishmania major* “**

2011 Joint annual meeting, Deutsche Gesellschaft für Immunologie, 29.Sept. 2011, Riccione, Italien

**“In the experimental model of leishmaniasis myeloid-derived suppressor cell functions and interaction with parasites differs between C57BL/6 and BALB/c “**

Biomedical Symposium for Graduate Students, 4.-5. Nov. 2011, Regen

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mir bei dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Uwe Ritter, der mir dieses sehr interessante Thema über die Leishmaniose zur Verfügung gestellt hat und mich in den letzten drei Jahren immer unterstützt und gefördert hat. Vielen Dank für ein stets offenes Ohr bei Problemen und Fragen sowie die vielen Vorschläge und Anregungen. Unsere gemeinsamen Besprechungen waren stets von konstruktiven Diskussionen begleitet und haben mich immer aufgebaut, wenn es mal nicht so gut lief.

Ein großer Dank gilt auch Frau Professorin Dr. Daniela Männel, für die konstruktive Kritik, wertvollen Ratschläge und die Diskussionsbereitschaft auch während der Seminare.

Herrn PD Dr. Ger van Zandbergen möchte ich besonders für die stets freundliche Kommunikation und die konstruktiven Beiträge als externer Mentor dieser Arbeit danken.

Ich danke Dr. Nicole Zimara für die 3-jährige gute und ergänzende Zusammenarbeit im Labor.

Ebenso möchte ich sowohl den aktuellen als auch den ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie für die Bereitstellung ihres Wissens und die Unterstützung für diese Arbeit danken. Insbesondere danke ich Dr. Sven Mostböck und Dr. Anja Lechner für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie. Des Weiteren gilt mein Dank den Operatoren des FACS-Aria Durchflusszytometers: Jaqueline Igl, Dr. Monique Geremodt und Rüdiger Eder.

Bei Dr. Christian Florian bedanke ich mich für die tolle Atmosphäre im Labor während der Anfangszeit dieser Arbeit.

Bei Dorothea Weber-Steffens bedanke ich mich für die große Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur.



Bei Karin Holz bedanke ich mich für die Hilfe im Tierstall und im Laboralltag.

Ich bedanke mich bei allen Praktikanten die zu dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei Sarina Männich.

Danke auch Luise für die Unterstützung bei allen organisatorischen und bürokratischen Fragen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während meiner Doktorarbeit stets unterstützt hat. Auch Doris Bayerl möchte ich danken für die seelische und moralische Unterstützung während der vergangenen Monate.